

Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen im Rahmen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation im Kindesalter

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anne Skorna
geboren am 29. September 1984
in Hoyerswerda

Gutachter:

1: PD Dr. med. habil. Bernd Gruhn

2: PD Dr. med. Sebastian Scholl

3: Prof. Dr. med. Daniel Steinbach

Tag der öffentlichen Verteidigung:

05.05.2014

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aGvHD	akute Graft-versus-Host-Erkrankung
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zellen
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATG	Antithymozytenglobulin
bzw.	beziehungsweise
BU	Busulfan
°C	Grad Celsius
CAM	Campath [®] , Alemtuzumab
CD	cluster of differentiation
CFU-GM	colony forming units for granulocytes and macrophages
cGvHD	chronische Graft-versus-Host-Erkrankung
CML	chronische myeloische Leukämie
CP	chronische Phase, engl. chronic phase
CR	komplette Remission, engl. complete remission
CsA	Ciclosporin A
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA4	cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CY	Cyclophosphamid
d	Tag
d.h.	das heißt
DIFF	Differenz
dl	Deziliter
DLT	Spender-Lymphozyten-Transfusion, engl. donor lymphocyte transfusion
DRST	Deutsches Register für Stammzelltransplantationen
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECD	electron coupled dye
EFS	ereignisfreies Überleben, engl. event-free survival

engl.	englisch
FK506	Tacrolimus
FLU	Fludarabin
FOXP3	Forkhead Box P3
FS	Vorwärtsstreulicht, engl. forward scatter
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GITR	glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung, engl. graft-versus-host disease
GvL-Effekt	Graft-versus-Leukemia-Effekt
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IBMTR	International Bone Marrow Transplant Registry
ICOS	inducible costimulatory molecule
IgG1	Immunglobulin G1
IKK _{Lin}	Intraklassenkorrelationskoeffizient nach Lin
IL-1	Interleukin 1
IFN- γ	Interferon gamma
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
m	männlich
max.	Maximum
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MEL	Melphalan
mg	Milligramm
mHA	Minorhistokompatibilitätsantigen
min.	Minimum
MMF	Mycophenolatmofetil
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter

MHC	major histocompatibility complex
MTX	Methotrexat
n	Anzahl
n.a.	nicht angegeben
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
n.s.	nicht signifikant
nT _{reg} Zellen	natürliche regulatorische T-Zellen
OKT3	Muromonab-CD3
p	Signifikanz
PBMNZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBSZ	periphere Blutstammzellen
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Carbocyanin 5
PRED	Prednison
SAA	schwere aplastische Anämie
sd	Standardabweichung
SS	Seitwärtsstreulicht, engl. side scatter
TBI	Ganzkörperbestrahlung, engl. total body irradiation
Tbl.	Tabelle
TGF β	Transforming growth factor beta
T _{h1}	T-Helferzellen Typ 1
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg} Zellen	regulatorische T-Zellen
TRM	transplantationsassoziierte Mortalität, engl. transplant related mortality
TT	Thiotepa
u.a.	unter anderem
UCB	Nabelschnurblut, engl. umbilical cord blood
VP16	Vepesid [®] , Etoposid
vs.	versus
w	weiblich

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Grundlagen der Stammzelltransplantation	3
2.1.1 Formen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation	4
2.1.2 Indikationen zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation	4
2.1.3 Spenderauswahl	5
2.1.4 Stammzellquelle	5
2.1.5 Konditionierung	6
2.1.6 Rekonstitution des Immunsystems	7
2.1.7 Chimärismus	7
2.2 Graft-versus-Host-Erkrankung	8
2.2.1 Klinik der GvHD	8
2.2.2 Pathophysiologie und Risikofaktoren der GvHD	10
2.2.3 Prophylaxe und Therapie der GvHD	12
2.3 Regulatorische T-Zellen	14
2.3.1 Charakterisierung der T _{reg} Zellen	15
2.3.2 Die Rolle von T _{reg} Zellen bei der GvHD	16
3 Ziele der Arbeit	18
4 Patienten, Materialien und Methoden	19
4.1 Patienten	19
4.2 Materialien	23
4.2.1 Geräte und Reagenzien	23
4.2.2 Antikörper	24
4.3 Methoden	25
4.3.1 Durchflusszytometrie	25
4.3.1.1 Grundlagen	25
4.3.1.2 Durchführung	25

4.3.1.3 Auswertung der Daten mit der Expo 32 Software.....	26
4.3.2 Statistische Auswertung.....	27
4.3.2.1 Boxplots.....	28
4.3.2.2 Intraklassenkorrelation nach Lin	28
4.3.2.3 Residuenplot nach Bland und Altman	28
5 Ergebnisse	30
5.1 Korrelation $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen.....	30
5.2 Quantitativer Nachweis der T_{reg} Zellen	32
5.2.1 Vergleich der T_{reg} Zellzahl mit einer Kontrollgruppe.....	33
5.3 Analyse des Therapieergebnisses unabhängig von T_{reg} Zellen	35
5.3.1 Akute GvHD	35
5.3.2 Chronische GvHD	37
5.3.3 Rezidiv	39
5.3.4 Überleben.....	39
5.4 Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Therapieergebnis der allogenen HSZT	41
5.4.1 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD	41
5.4.2 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die chronische GvHD.....	43
5.4.3 Einfluss der T_{reg} Zellen auf Rezidive	44
5.4.4 Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Überleben.....	45
6 Diskussion	46
6.1 Nachweis von T_{reg} Zellen.....	46
6.1.1 Korrelation von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen.....	46
6.1.2 Methodische Diskussion	49
6.1.3 Rekonstitution der T_{reg} Zellen nach HSZT im Vergleich zu einer Kontroll- gruppe.....	51
6.2 Therapieergebnis unabhängig von T_{reg} Zellen.....	54
6.2.1 Risikofaktoren der GvHD nach allogener HSZT im Kindesalter.	54
6.2.2 Rezidiv und Überleben bei allogenen transplantierten pädiatrischen Patienten.....	59
6.3 Therapieergebnis in Abhängigkeit von T_{reg} Zellen	62
6.3.1 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD	62
6.3.2 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die chronische GvHD	65
6.3.3 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die Rezidivrate und das Gesamtüberleben.....	66

7 Schlussfolgerung	68
8 Literaturverzeichnis	69
9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	86
<i>9.1. Abbildungsverzeichnis</i>	86
<i>9.2 Tabellenverzeichnis</i>	87
10 Anhang	88
<i>10.1 Ehrenwörtliche Erklärung</i>	88
<i>10.2 Danksagung</i>	89

1 Zusammenfassung

Trotz der Möglichkeit, Kinder mit hämatologischen, onkologischen oder nicht-malignen Systemerkrankungen durch eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) zu heilen, ist diese Behandlung mit einer hohen Rate an Komplikationen assoziiert. Die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) ist dabei die häufigste und eine verlaufsdominierende Komplikation der allogenen HSZT. Neue Therapieoptionen sind zwingend notwendig. Die Forschung an regulatorischen T-Zellen (T_{reg} Zellen) ist ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Unterdrückung der GvHD.

Die vorliegende Arbeit untersuchte verschiedene Methoden zum Nachweis von T_{reg} Zellen mittels Durchflusszytometrie sowie den Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Therapieergebnis nach allogener HSZT. Dafür wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMNZ) von 70 Patienten analysiert, deren allogene HSZT im Zeitraum 05/1994 bis 04/2007 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena stattfand. Die Kontrollgruppe wurde aus 17 gesunden Kindern und Jugendlichen gebildet.

FOXP3 gilt als aktueller Goldstandard zum Nachweis von T_{reg} Zellen. Da sich dieser Transkriptionsfaktor im Zellkern befindet, ist für die Markierung eine Permeabilisierung der Zellen notwendig. Sie stehen anschließend für vitale Untersuchungen oder zu therapeutischen Zwecken nicht mehr zur Verfügung. Eine kontrovers diskutierte Alternative zum Nachweis von T_{reg} Zellen bietet das Oberflächenmolekül CD127. Wir ermittelten eine signifikante Korrelation zwischen $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen. Wir zeigten damit, dass $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen der Subpopulation der T_{reg} Zellen entsprechen. Dies bietet die Möglichkeit zum zeit- und kostengünstigeren Nachweis, sowie der weiteren Verwendung der T_{reg} Zellen.

Wir ermittelten die relative Anzahl der T_{reg} Zellen bei stammzelltransplantierten und gesunden Kindern und Jugendlichen. Damit wurde erstmals die T_{reg} Zellzahl bei einer gesunden pädiatrischen Kontrollgruppe erhoben. Es konnten somit Vergleichsdaten für weitere Studien zur Verfügung gestellt werden. Wir führten ferner eine Analyse möglicher Einflussfaktoren auf das Therapieergebnis der HSZT durch, darunter Alter und Geschlecht der Patienten, Grunderkrankung, Konditionierungsregime, verwendete Stammzellquelle,

HLA-Kompatibilität, Familien- oder Fremdspende sowie Geschlechterdiskrepanz. Wir verglichen die Daten mit den Inzidenzen der akuten und der chronischen GvHD sowie der Zahl der Rezidive und der im Beobachtungszeitraum verstorben Patienten.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Ermittlung des Einflusses der T_{reg} Zellen auf das Therapieergebnis nach allogener HSZT, d.h. auf die Entwicklung einer akuten oder chronischen GvHD, eines Rezidivs sowie auf das Gesamtüberleben. Die Auswertung des Therapieergebnisses erfolgte retrospektiv nach der Ermittlung der T_{reg} Zellzahl. Die T_{reg} Zellzahl wurde zum Zeitpunkt vor HSZT, sowie an den Tagen 30, 60 und 100 nach HSZT bestimmt. Vor diesem Hintergrund konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die akute GvHD mit der T_{reg} Zellzahl der Patienten vor HSZT invers korreliert. Damit könnte man zukünftig die T_{reg} Zellzahl des Empfängers vor HSZT als Prognoseparameter für die Entwicklung einer akuten GvHD heranziehen. Individualisierte Regime zur GvHD-Prophylaxe könnten entwickelt werden. Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die T_{reg} Zellzahl keinen Einfluss auf die Entwicklung von Rezidiven und das Gesamtüberleben hat. Dies lässt vermuten, dass in der prophylaktischen Infusion oder *in vivo* Expansion von T_{reg} Zellen bei Risikopatienten eine sehr gute Prophylaxe-Strategie liegt, ohne der Gefahr auf die Entwicklung von weiteren Komplikationen.

Wir konnten aktuelle Forschungsergebnisse, welche einen signifikanten Zusammenhang zwischen der T_{reg} Zellzahl der Patienten nach HSZT und der Entwicklung einer GvHD sehen, nicht bestätigen. Ergebnisse zur chronischen GvHD zeigten sich ebenfalls nicht signifikant. Es bedarf zukünftiger weiterer Studien mit größeren Patientenzahlen.

2 Einleitung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) ist für viele hämatologische, onkologische und nicht-maligne Systemerkrankungen eine routinemäßige Behandlung. Für einige Patienten stellt sie die einzige kurative Therapie dar. Für den Erfolg dieser Behandlung sind neben der hochdosierten Strahlen- bzw. Chemotherapie vor allem Spender-T-Zellen des Transplantats verantwortlich. Diese lösen jedoch neben der gewünschten antileukämischen Wirkung, dem sogenannten Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL), die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (engl. graft-versus-host disease, GvHD) aus. Bei der GvHD handelt es sich um eine der Hauptkomplikationen der allogenen HSZT. Trotz Fortschritten in der Prävention und Behandlung geht die GvHD mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Neue Therapieansätze sind dringend erforderlich.

Die Forschung an regulatorischen T-Zellen (T_{reg} Zellen) ist ein vielversprechender Ansatzpunkt zur Unterdrückung der GvHD. T_{reg} Zellen sind eine spezialisierte Untergruppe $CD4^+$ T-Lymphozyten. Sie übernehmen regulatorische Funktionen im Immunsystem. Sie unterdrücken überschießende Immunreaktionen gegen Fremdanigene und schützen vor der Zerstörung von körpereigenem Gewebe durch autoreaktive T-Zellen, indem sie eine Selbsttoleranz vermitteln.

Die folgenden Abschnitte dienen im Allgemeinen zum Verständnis der Grundlagen der HSZT und ihrer Hauptkomplikation, der GvHD. Es wird über die GvHD beeinflussende Faktoren informiert, ferner werden aktuelle Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten vorgestellt. Im Speziellen wird auf die Rolle der T_{reg} Zellen und deren Nachweis eingegangen.

2.1 Grundlagen der Stammzelltransplantation

Bereits im 19. Jahrhundert wurden Patienten mit Knochenmark behandelt. Als Folge der Atombombenexplosionen von Hiroshima und Nagasaki wurde die Neuzeit der allogenen Stammzelltransplantation mit der Erforschung des Knochenmarks eingeleitet. Tiermodelle gingen den ersten klinischen Transplantationen auf der Grundlage der HLA-Typisierung voraus (Kröger und Zander 2008). Dank der nachgewiesenen Effektivität bei zahlreichen Erkrankungen, der zunehmenden Verfügbarkeit von geeigneten Spendern und der Einführung

dosisreduzierter Konditionierungsregime nimmt die Zahl der HSZT stetig zu. So steigt die Zahl der HSZT seit 2004 allein in Europa um jährlich etwa 1000 HSZT an (Baldomero et al. 2011).

2.1.1 Formen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Grundsätzlich lassen sich folgende Formen der HSZT unterscheiden: syngene, autologe und allogene HSZT. Während bei der seltenen syngen Transplantation Knochenmark oder periphere Blutstammzellen (PBSZ) eines eineiigen Zwillings übertragen werden, stammen die Zellen bei der autologen Transplantation vom Spender selbst. Letztere ermöglicht eine hochdosierte Chemo- oder Radiotherapie bei verschiedenen malignen Erkrankungen. Voraussetzung für diese Behandlung ist ein zu irgendeinem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf verfügbares gesundes eigenes Knochenmark (Kolb 2000). Diese Dissertation konzentrierte sich auf die allogene HSZT. Darunter versteht man die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen eines gesunden, immungenetisch fremden Spenders. Das Prinzip der allogenen HSZT bei malignen Erkrankungen beruht sowohl auf dem Ersatz des durch eine hochdosierte myelosuppressive Therapie zerstörten lymphohämatopoetischen Systems, als auch auf die T-Zell-vermittelte Reaktion des übertragenen Transplantats, dem sogenannten GvL-Effekt. Bei benignen Erkrankungen ist es Ziel der Behandlung, gestörte oder fehlende Stammzellen durch die eines gesunden Spenders zu ersetzen.

2.1.2 Indikationen zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation

Das Deutsche Register für Stammzelltransplantationen (DRST) veröffentlichte in seinem Jahresbericht, dass 2010 in Deutschland 2615 allogene Ersttransplantationen durchgeführt wurden. Die Hauptindikationen waren Leukämien (74,1 %), lymphoproliferative Erkrankungen (18,3 %) und nicht-maligne Erkrankungen (5,9 %) wie die schwere aplastische Anämie (SAA), Hämoglobinopathien oder auch primäre Immundefekte. Seltener wurde die Indikation aufgrund der Diagnose eines soliden Tumors (0,8 %), wie dem Neuroblastom und dem Ewing-Sarkom, oder sonstigen Erkrankungen (0,6 %) wie Autoimmunerkrankungen gestellt (DRST 2010).

2.1.3 Spenderauswahl

Fortschritte in der Beschreibung und Bestimmung der humanen Leukozyten-Antigene (HLA) haben einen wesentlichen Anteil am Erfolg der HSZT. Sie sind entscheidend für ein stabiles Engraftment, dem Anwachsen transfundierter Stammzellen, und wichtigstes Kriterium bei der Spenderauswahl für allogene HSZT. Die Histokompatibilität zwischen Empfänger und Spender ergibt sich im Wesentlichen aus der Übereinstimmung der HLA-Merkmale der Klasse I (HLA-A, B, C) und Klasse II (HLA-DR, DQ, DP), die im major histocompatibility complex (MHC) auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 kodiert sind. Ein Spender gilt nach gegenwärtigem Stand als vollständig HLA-kompatibel, wenn die HLA-Moleküle A, B, C, DRB1 und DQB1 übereinstimmen. HLA-identische Geschwister sind bevorzugte Spender, diese stehen aber nur bei etwa 25 % der Patienten zur Verfügung. Weltweit werden über zehn Millionen freiwillig Registrierte in Spenderdateien geführt. Laut DRST überstieg 2001 erstmals die Zahl der Fremdspender die der verwandten Spender. Damit liegt die Wahrscheinlichkeit einen passenden nicht-verwandten Spender für einen Patienten der kaukasischen Rasse zu finden bei über 80 % (Ottinger et al. 2001, Scheffold et al. 2004, Kröger und Zander 2008, DRST 2010). Neben den humanen-Leukozyten Antigenen rücken zunehmend auch die Minorhistokompatibilitätsantigene (mHA) in das Visier der Forscher. Sie scheinen für Abstoßungs- und GvH-Reaktionen bei HSZT von HLA-identischen Geschwistern verantwortlich zu sein. Sie werden jedoch bisher bei der Spenderauswahl nicht berücksichtigt. Findet sich kein HLA-identisches Geschwister bzw. kein HLA-kompatibler nicht-verwandter Spender, kann eine haploidentische Transplantation erfolgen, bei der Stammzellen der Eltern übertragen werden. Dieses Verfahren ist durch intensiviertete Konditionierung, T-Zell-Depletion des Transplantats und Übertragung großer Stammzellmengen klinisch realisierbar geworden, jedoch mit einem hohen Risiko verbunden (Scheffold et al. 2004).

2.1.4 Stammzellquelle

Hämatopoetische Stammzellen sind charakterisiert durch ihre regenerative Kapazität sowie durch ihre Fähigkeit, nach intravenöser Gabe ins Knochenmark zu migrieren und sich dort zu differenzieren. Dies macht es möglich, beim Patienten ein komplettes und anhaltendes lymphohämatopoetisches System zu etablieren. Dabei wird die Fähigkeit einer isolierten

hämatopoetischen Stammzelle *in vitro* unter entsprechenden Kulturbedingungen Kolonien von granulozytären Vorläuferzellen (colony forming units for granulocytes and macrophages, CFU-GM) zu bilden genutzt, um vor Transplantation die Vitalität und Regenerationsfähigkeit der Zellen zu bestimmen. Schneller und ebenso zuverlässig ist die Bestimmung der Zahl von CD34⁺ Zellen. Dieses Oberflächenantigen ist ausschließlich auf frühen Vorläuferzellen der Hämatopoese zu finden. Im Laufe ihrer Reifung und Differenzierung verliert es sich (Wolf und Sayer 2006).

Das Stammzelltransplantat kann zurzeit aus drei verschiedenen Quellen gewonnen werden: Bei der klassischen Knochenmarktransplantation wird Knochenmark vom Beckenkamm aspiriert. Die Gewinnung PBSZ hat den Vorteil der Vermeidung einer Operation in Vollnarkose, außerdem ist mit einem rascheren Engraftment und einer beschleunigten Rekonstitution des Immunsystems zu rechnen (Wolf und Sayer 2006, Bittencourt et al. 2009, Ottinger et al. 1996). Durch die Behandlung des Spenders mit hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) oder granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), werden Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert und anschließend durch Leukapherese aus dem peripheren Blut gewonnen. Nabelschnurblut (engl. umbilical cord blood, UCB) wird bei der Geburt Neugeborener gesammelt und anschließend kryokonserviert in sogenannten Cord Blood-Banken gelagert. Da die T-Zellen aus dem fetalen Kreislauf einen deutlich niedrigeren Proliferationseffekt nach allogener HSZT zeigen, als die von erwachsenen Spendern, werden auch bei Einsatz als Fremdspondertransplantat weniger Abstoßungskomplikationen und mildere GvH-Reaktionen beschrieben (Brunstein et al. 2007, Wolf und Sayer 2006, Kröger und Zander 2008).

2.1.5 Konditionierung

Vor der eigentlichen allogenen HSZT muss eine hochdosierte Chemo- und / oder Radiotherapie stattfinden, die sogenannte Konditionierung. Diese soll folgende drei Funktionen erfüllen: die Induktion einer Immunsuppression, um ein sicheres Engraftment zu gewährleisten, die Induktion einer Myeloablation, um Platz für die Spenderhämatopoese zu schaffen, und die Beseitigung der ursächlichen hämatopoetischen Systemerkrankung. Neben myeloablativen Standard-Konditionierungsregimen stehen heute auch dosisreduzierte

Konditionierungsschemata zur Verfügung. Durch die Ausnutzung immunologisch vermittelter GvL-Effekte finden diese weniger intensiven und deshalb besser tolerierbaren nicht-myeloablativen Therapien vor allem bei älteren Patienten Anwendung (Appelbaum 2009, Kröger und Zander 2008).

2.1.6 Rekonstitution des Immunsystems

Nach Konditionierung und Durchführung der HSZT folgt das Anwachsen der Spenderstammzellen im Knochenmark des Empfängers. Dieser Prozess wird als Engraftment bezeichnet. Zuvor befinden sich die Patienten in einer Phase der schweren Neutropenie, die man als Aplasie bezeichnet. Sie ist durch die Gefahr lebensbedrohlicher Infektionen und einen hohen Transfusionsbedarf geprägt. Mittels Isolation in einer speziellen Einheit und breiter Infektionsprophylaxe wird versucht, die Risiken zu reduzieren (Cramer 2009). Der zeitliche Verlauf des Engraftments ist von zahlreichen Einflussfaktoren abhängig. Die Stammzellquelle, der Einsatz von Wachstumsfaktoren sowie die Art der GvHD-Prophylaxe nehmen dabei wesentlich Einfluss auf die Rekonstitution. Es dauert zirka 2 bis 3 Wochen bis das Transplantat angeht (engl. take) und die Blutbildung übernimmt. Die Rekonstitution des hämatopoetischen Systems ist bei erfolgreicher Transplantation nach zirka 2 Monaten abgeschlossen. Hingegen kann die Wiederherstellung aller Komponenten und Funktionen des Immunsystems bis zu zwei Jahre benötigen (Kolb 2003, Cramer 2009). Die T-Zell-Rekonstitution nach HSZT verläuft auf zwei Wegen. Die periphere antigengetriggerte Expansion reifer transplantierte T-Zellen ist thymusunabhängig. Werden $CD34^+$ selektionierte Stammzellen, d.h. unreife Zellen, transplantiert, verläuft die Rekonstitution verlangsamt ab. Über den zentralen Weg erfolgt eine *de novo*-Synthese der T-Zellen aus den transplantierten Vorläuferzellen. Aufgrund der Thymusinvolutions bei Erwachsenen schreitet die Rekonstitution des Immunsystems im Kindesalter deutlich schneller voran.

2.1.7 Chimärismus

Der Patient trägt nach einer erfolgreichen allogenen HSZT genetisch und somit auch immunologisch fremdes Material in sich. Diese Koexistenz von Geweben und Organen verschiedenen Ursprungs wird, in Anlehnung an die griechische Mythologie, als Chimärismus bezeichnet. Bei einer allogenen HSZT entsteht im Gegensatz zur Organtransplantation ein

hämatopoetischer echter Chimärismus, da sich nach einiger Zeit eine volle immunologische Toleranz zwischen Transplantat und Empfänger entwickelt. So werden auch andere Organe vom selben Spender ohne Immunsuppression akzeptiert. Zunächst entwickelt sich ein gemischter Chimärismus, bei der Spender- und Empfänger-Hämatopoese nebeneinander existieren (Kröger und Zander 2008). Bei einer myeloablativen Konditionierung wird ein kompletter Chimärismus schon nach kurzer Zeit erreicht, während bei einer dosisreduzierten Konditionierung die Empfänger-Hämatopoese allmählich verdrängt werden muss. Überleben weiterhin hämatopoetische Zellen des Empfängers und konkurrieren mit der Hämatopoese des Spenders, so ist es möglich die Empfängerstammzellen durch eine Transfusion von Spender-lymphozyten (engl. donor lymphocyte transfusion, DLT) zu verdrängen, um den angestrebten vollständigen Chimärismus zu erreichen (Kolb et al. 1990, Van Rhee und Kolb 1995, Cramer 2009). Der Chimärismus stellt somit einen Indikator für den Erfolg der Transplantation dar.

2.2 Graft-versus-Host-Erkrankung

Neben Transplantatabstoßung, Infektionen und Rezidiven ist die GvHD die verlaufsdominierende und zugleich häufigste Komplikation nach allogener HSZT (Scheffold et al. 2004). Die akute GvHD tritt definitionsgemäß innerhalb der ersten 100 Tage nach HSZT auf. Die chronische GvHD ist ein Syndrom mit polymorphem Erscheinungsbild, welches ab dem 100. Tag nach der Transplantation auftreten kann. Diese Einteilung ist historisch bedingt, die verzögerte akute GvHD sowie das sogenannte Overlap-Syndrom werden dabei nicht berücksichtigt. Neue Standards wurden unter Berücksichtigung klinischer, immunologischer und histologischer Kriterien unter anderem von den Gruppen um Filipovich und Griffith erarbeitet (Filipovich et al. 2005, Griffith et al. 2008, Ferrara et al. 2009).

2.2.1 Klinik der GvHD

Hauptmanifestationsorte der akuten GvHD sind neben der Hämatopoese und dem Immunsystem, die Haut, die Leber und der Gastrointestinaltrakt. Die prognostisch relevante Gradeinteilung nach Glucksberg basiert auf dem Stadium dieser Organmanifestation und der Einschränkung des Allgemeinzustands (siehe Tabelle 2.1). In den letzten Jahren haben sich bei der Anwendung dieser Schweregradeinteilung zunehmend Schwachpunkte gezeigt, sodass 1997 mit dem IBMTR (International Bone Marrow Transplant Registry) Severity Index eine

Überarbeitung der Organklassifikation mit ausschließlichem Aufbau auf objektive Parameter eingeführt wurde (Rowlings et al. 1997). Dieser konnte sich jedoch in der klinischen Praxis nicht einheitlich durchsetzen. Die Einteilung der akuten GvHD ist von großer Bedeutung, da das Überleben direkt mit dem GvHD-Schweregrad korreliert. Über 90 % der Patienten mit Grad I, etwa 60 % der Transplantierten mit Grad II – III und nahezu 0 % der an Grad IV Erkrankten überleben (Karrer 2003).

Tab. 2.1: Organstadien der akuten GvHD nach Glucksberg

(Glucksberg et al. 1974, Carpenter und Macmillan 2010).

Stadium	Haut	GIT (Diarrhoe)	Leber
		Erwachsene / Kinder	(Bilirubin)
0	Kein Exanthem	< 500 ml/d < 10 ml/kg KG/d	< 2 mg/dl
1	Exanthem < 25 % der KOF	500 – 1000 ml/d 10 – 19,9 ml/kg KG/d	2 – 3 mg/dl
2	Exanthem 25 – 50 % der KOF	1000 – 1500 ml/d 20 – 30 ml/kg KG/d	3 – 6 mg/dl
3	Generalisiertes Exanthem	> 1500 ml/d > 30 ml/kg KG/d	6 – 15 mg/dl
4	Desquamation und Bullae	Zusätzlich Koliken, Ileus und Blutungen	> 15 mg/dl

Schweregrad	Hautstadium	Darmstadium	Leberstadium	Reduktion des Allgemeinzustands
I	1 – 2	0	0	Keine
II	1 – 3	1	und / oder 1	leicht
III	2 – 3	2 – 3	und / oder 2 – 3	mäßig
IV	2 – 4	2 – 4	und / oder 2 – 4	deutlich

GIT = Gastrointestinaltrakt, KOF = Körperoberfläche, KG = Körpergewicht.

Zwei bis vier Wochen nach Transplantation zeigt sich zumeist als erstes und häufigstes Symptom der akuten GvHD ein makulopapulöses Erythem, gefolgt von fortbestehenden Durchfällen, einer Hepatopathie mit Erhöhung des Bilirubins, der Transaminasen und der alkalischen Phosphatase sowie Allgemeinsymptomen wie Fieber und Gewichtsverlust. Da

differenzialdiagnostisch auch immer Infektionen, konditionierungsassoziierte Komplikationen und Arzneimittelnebenwirkungen in Betracht gezogen werden müssen, sollte bei den genannten Symptomen eine biopsische Sicherung angestrebt werden. Diese zeigt im positiven Fall eine Endothelschädigung und lymphozytäre Infiltrate (Appelbaum 2009, Kolb 2003). Liegen jedoch mit Thrombozytopenie und Blutungsneigung Kontraindikationen zur Biopsie vor, muss vor allem bei Darm- und Leber-GvHD die Diagnose aus der Symptom- und Organkombination oder aus indirekten Parametern, u.a. mittels Darmsonographie, gestellt werden (Kröger und Zander 2008).

Das klinische Bild der chronischen GvHD ähnelt dem einer Autoimmunerkrankung. Sie ist durch sklerodermiforme und lichenoidale Haut-, Schleimhaut- und Weichteilveränderungen, Sicca-Symptomatik, entzündlich-desquamative und fibrosierende Manifestationen im Gastrointestinaltrakt, cholestatisch verlaufender Leberdysfunktion und Lungenbeteiligung in Form einer Bronchiolitis obliterans gekennzeichnet (Scheffold et al. 2004, Appelbaum 2009). Unterschieden werden je nach Organbeteiligung die limitierte und die extensive chronische GvHD (Ratanatharathorn et al. 2001). Liegt lediglich ein lokaler Hautbefall vor, spricht man von der limitierten chronischen GvHD. Diese erfordert häufig keine therapeutischen Maßnahmen. Die extensive Form zeichnet sich durch einen generellen Hautbefall oder lokale Hautveränderungen in Kombination mit einem Befall weiterer Organsysteme, wie Augen, Mund, Leber oder Gastrointestinaltrakt, aus (Shulman et al. 1980).

2.2.2 Pathophysiologie und Risikofaktoren der GvHD

Billingham definierte 1966 drei Voraussetzungen für die Entstehung einer GvHD:

1. Das Transplantat muss eine ausreichende Anzahl immunkompetenter Zellen enthalten.
2. Der Empfänger muss Alloantigene exprimieren, die beim Spender fehlen und somit vom Transplantat als fremd erkannt werden.
3. Der Empfänger darf keine suffiziente Immunantwort geben können (Billingham et al. 1966).

Diese vereinfachte Definition hat zwar noch ihre Gültigkeit, an der Entstehung der GvHD wirken aber zahlreiche weitere Faktoren mit. Die akute GvHD resultiert aus einem äußerst komplexen Zusammenspiel konditionierungsassoziiierter Entzündung, dem Einschwemmen

von Endotoxinen und der Aktivierung alloreaktiver Zellen. Deshalb wird heute ein international anerkanntes 3-Stufen-Modell der Pathophysiologie favorisiert. Verschiedene Zellpopulationen des Empfängers und des Spenders wie auch Entzündungsmediatoren interagieren in einer Kaskade, die schließlich zum Zelltod in den Zielorganen der GvHD führt. Die erste Phase beinhaltet die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen (APC) durch die zugrundeliegende Erkrankung und das Konditionierungsregime. Insbesondere hat die Bestrahlung eine Schädigung von Gewebe des Empfängers zur Folge, woraufhin Entzündungsmediatoren wie Interleukin 1 (IL-1), IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF) und Interferon γ (IFN- γ) sezerniert werden. Dies führt zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen, MHC-Antigenen und kostimulatorischen Molekülen auf APC des Empfängers. Durch das Eindringen von Endo- und anderen bakteriellen Toxinen über die geschädigten Schleimhautbarrieren wird diese Inflammation, aber auch der apoptotische Zellschaden massiv verstärkt. Umgekehrt besteht aufgrund der Sensibilisierung des Makrophagensystems durch T-Helferzellen Typ 1 (T_{H1})-Zytokine wie IFN- γ auch eine extrem erhöhte Lipopolysaccharid-Empfindlichkeit. In der zweiten Phase kommt es bei entsprechender Differenz in den HLA-minor-Antigenen oder bei major HLA-Differenz zu einer Erkennung der von APC exprimierten Fremdan Antigene des Empfängers durch immunologisch kompetente T-Zellen des Spenders. Diese werden aktiviert und sezernieren IL-2, TNF und IFN- γ . Weitere T-Zellen, ebenso zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), Monozyten und Makrophagen werden angelockt und aktiviert. Die dritte Phase beinhaltet die Gewebeerstörung durch die sezernierten Zytokine, der sogenannte Zytokinsturm, und die zellvermittelte Zytotoxizität durch CTL und NK-Zellen (Ferrara et al. 2009, Rupec und Plewig 2004, Kröger und Zander 2008, Nestel et al. 1992).

Neben einer gestörten Selektion der neu heranreifenden T-Zellen im durch Konditionierung und akute GvHD geschädigten Thymus wird auch ein zunehmender Shift der Zytokinproduktion in Richtung einer Aktivierung von T_{H2} -Zellen für die Pathogenese der chronischen GvHD verantwortlich gemacht. Alloreaktive T-Zellen produzieren vermehrt Zytokine wie IL-4 oder IFN- γ und induzieren damit die Kollagensynthese durch Fibroblasten. Die einer Autoimmunerkrankung ähnelnden klinischen Befunde der chronischen GvHD können damit erklärt werden (Ferrara et al. 2009, Karrer 2003).

Risikofaktoren, an einer GvHD zu erkranken, sind neben der Bedeutung der Histokompatibilität, dem initialen Krankheitsstatus und der Gewebeschädigung durch die Konditionierung, das mikrobielle Milieu des Interstitiums, virale Infektionen bei Spender und Empfänger, Multitransfusionen und eine Splenektomie beim Patienten (Goker et al. 2001). Die GvHD-Inzidenz bei älteren Patienten und bei Patienten, die keine volle GvHD-Prophylaxe erhalten können, ist ebenfalls erhöht (Appelbaum 2009). Ein Geschlechter-Mismatch zwischen Patient und Spender hat sich ebenso als ungünstig erwiesen. Ist der Spender weiblich und hat bereits mehrfach entbunden, ist das Risiko aufgrund einer möglichen Sensibilisierung gegen das männliche HY-Antigen für einen männlichen Patienten an einer GvHD zu erkranken mit bis zu 68 % deutlich erhöht (Weisdorf et al. 1991). Die Stammzellquelle als Risikofaktor ist Gegenstand zahlreicher Studien. Diese zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Verwendung von PBSZ oder Knochenmark bezüglich des Auftretens einer akuten GvHD. Jedoch ist das Risiko nach der Transplantation von PBSZ an einer chronischen GvHD zu erkranken um 15 bis 20 % erhöht (Bensinger 2012, Stamatović et al. 2011, Pidala et al. 2009). Ob Nabelschnurblut hinsichtlich des GvHD-Risikos Vorteile gegenüber der Verwendung von Knochenmark bzw. PBSZ zeigt, wird kontrovers diskutiert (Brunstein et al. 2007, Eapen et al. 2007).

2.2.3 Prophylaxe und Therapie der GvHD

Das Auftreten einer akuten GvHD gilt als wichtigster prädisponierender Faktor für die Entwicklung einer chronischen GvHD und der klinische Schweregrad korreliert mit dem Überleben der Patienten (Karrer 2003, Kröger und Zander 2008). Aus diesen Gründen kommen der Prophylaxe und der Therapie der akuten GvHD eine besondere Stellung innerhalb des Bereichs der allogenen HSZT zu.

Neben der Vermeidung von Risikofaktoren, welche sowohl die Suche eines passenden Spenders als auch das Abwägen der geeigneten Stammzellquelle beinhaltet, gibt es verschiedene Elemente der GvHD-Prävention. Zum einen kann ein keimsaniertes Darmmilieu das Risiko für die Entwicklung einer gastrointestinalen GvHD verringern, da anaeroben Mikroorganismen ein Triggereffekt in Bezug auf die Alloreaktivität der Spender-T-Zellen zukommen soll. Durch eine antibiotische Prophylaxe mit Metronidazol vor und während der Transplantationsphase wird dies erreicht. Das GvHD-Risiko kann zum anderen durch eine

pharmakologische Immunsuppression und die T-Zell-Depletion gesenkt werden. Die Kombination von dem Folsäure-Antagonisten Methotrexat (MTX) mit den Calcineurin-Inhibitoren Ciclosporin A (CsA) oder Tacrolimus (FK506) stellen die effektivsten und am weitesten verbreiteten Regime dar. Kortikosteroide (Prednison), Mycophenolatmofetil (MMF) und andere Immunsuppressiva werden daneben in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt und in Studien getestet (Appelbaum 2009). Antizelluläre Antikörper, wie das Antithymozytenglobulin (ATG), nehmen eine Zwischenstellung zwischen pharmakologischer Immunsuppression und T-Zell-Depletion ein. Sie können sowohl das Empfänger-Immunsystem unterdrücken, als auch den T-Zell-Gehalt des Stammzelltransplantats verringern. Die Haupteffektorzellen einer GvHD sind die Spender-T-Zellen. Es liegt deshalb nahe, dass durch die Verringerung der T-Zell-Last im Stammzelltransplantat, die GvHD-Rate gesenkt werden kann. Zur T-Zell-Depletion wurden bisher verschiedene Strategien angewandt: physikalische Methoden, zum einen die Negativselektion von T-Zellen, zum anderen die hauptsächlich verwendete Positivselektion von CD34⁺ Stammzellen, erfolgen ausschließlich *in vitro*. Antikörper, wie das bereits erwähnte polyklonale ATG und der gegen das Oberflächenantigen CD52 gerichtete monoklonale Antikörper Alemtuzumab (Campath[®]), können im Gegensatz dazu sowohl zur *in vitro*- als auch zur *in vivo*-Depletion verwendet werden (Kröger und Zander 2008). Es kommt allerdings neben dem reduzierten GvHD-Risiko zu vermehrten Abstoßungsreaktionen, Krankheitsrezidiven, Infektionen und der Häufung Epstein-Barr-Virus (EBV)-assoziierter lymphoproliferativer Erkrankungen (Ferrara et al. 2009). Gründe dafür sind eine unselektive Depletion notwendiger akzessorischer Zellen, welche für ein erfolgreiches Engraftment benötigt werden, und der durch T-Zell-Depletion deutlich verminderte GvL-Effekt.

Etwa 30 % der Patienten nach HLA-identischer Geschwistertransplantation und etwa 60 % nach Fremdspendertransplantation erkranken trotz Prophylaxe an einer relevanten akuten GvHD (Appelbaum 2009). Als Therapie-Goldstandard hat sich bis heute die Gabe von Methylprednisolon erwiesen. Das Ansprechen auf Steroide gilt als bester prognostischer Parameter, denn bei den 60 bis 70 % der Patienten, die auf diese Primärtherapie ansprechen, liegt die transplantationsassoziierte Mortalität (engl. transplant related mortality, TRM) bei nur 20 bis 30 % (Kröger und Zander 2008). Die zusätzliche Gabe zahlreicher Medikamente wie MMF, mono- oder polyklonale Antikörper zur Primärtherapie konnte die Prognose bis heute nicht verbessern. Denn jede Intensivierung der Therapie bedeutet auch eine

Intensivierung der Immundefizienz. Diese führt zum Auftreten schwerer viraler Infektionen und vor allem zu Mykosen. Nur 10 bis 20 % der GvHD-Patienten versterben an der GvHD selbst. Als Zweitlinientherapie stehen die bereits erwähnten mono- und polyklonalen Antikörper, MMF sowie Zytokinantagonisten wie der TNF- α -Blocker Infliximab und das gentechnologisch hergestellte Fusionsmolekül Etanercept zur Verfügung. Die Haupttherapie der chronischen GvHD besteht aus Kortikosteroiden. Die Kombination von CsA mit Prednison zeigt keine Unterschiede zu der alleinigen Steroidgabe (Koc et al. 2002). Jedoch liegen für die extrakorporale Photopherese sowohl in der Therapie der chronischen als auch der akuten GvHD vielversprechende Daten vor (Couriel et al. 2006).

Große Hoffnungen werden derzeit in zelluläre Therapien der GvHD gesetzt. Neben der Infusion mesenchymaler Stammzellen bei Patienten mit refraktärer GvHD stellen T_{reg} Zellen eine weitere wichtige Zellpopulation dar.

2.3 Regulatorische T-Zellen

Gershon und Kondo entwickelten bereits in den frühen 1970er Jahren die Theorie einer Population von Suppressor-T-Zellen. Es konnten jedoch weder die zugrunde liegenden suppressiven Mechanismen biochemisch und molekularbiologisch erklärt werden, noch gelang es, diese Lymphozytenpopulation näher zu charakterisieren (Gershon und Kondo 1970). Einen ersten Hinweis auf den Ursprung dieser Zellen ergab sich aus der Beobachtung postnatal thymektomierter Mäuse, welche schwere Autoimmunerkrankungen entwickelten (Nishizuka und Sakakura 1969). Damit vermutete man den Thymus als Entstehungsort der Suppressor-T-Zellen. Erst 1995 konnten Sakaguchi und Kollegen suppressive CD4⁺ T-Zellen, welche konstitutiv die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) exprimierten, für diesen Thymus abhängigen Effekt verantwortlich machen (Sakaguchi et al. 1995). Aufgrund ihrer modulierenden Eigenschaften werden sie regulatorische T-Zellen genannt. T_{reg} Zellen supprimieren die Aktivität allo- und autoreaktiver Effektor-T-Zellen und spielen somit eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Eigentoleranz (Shevach 2001). Sie regulieren die Homöostase des peripheren T-Zell-Pools und tragen zur Toleranzinduktion nach Organtransplantation bei (Murakami et al. 2002). In den letzten Jahren haben das Interesse und die Kenntnis um T_{reg} Zellen stark zugenommen. Man unterteilt sie in natürlich vorkommende und adaptive T_{reg} Zellen. Natürliche T_{reg} Zellen (nT_{reg}) werden im Thymus

generiert. Sie üben ihre suppressiven Eigenschaften zytokinunabhängig durch direkten Zellkontakt aus (Stock et al. 2006). Die nT_{reg} Zellen machen 6 bis 10 % der $CD4^+$ T-Zellpopulation im peripheren Blut von Mäusen aus, bei Menschen sind es 1 bis 2 % (Baecher-Allan et al. 2001). Adaptive T_{reg} Zellen hingegen entstehen in der Peripherie aus $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen infolge einer T-Zell-Aktivierung durch spezifische kostimulatorische Signale. Sie agieren vor allem durch eine Zytokinsekretion. Darunter finden sich die inhomogene Gruppe der IL10 sezernierenden und die über eine TGF β (transforming growth factor beta)-Sekretion modulierenden T_{reg} Zellen (Chen et al. 1994, Groux et al. 1997, Annacker et al. 2001). Die Rolle der adaptiven T_{reg} Zellen *in vivo* muss noch genauer erforscht werden. Im Fokus dieser Promotionsarbeit stehen die natürlichen T_{reg} Zellen.

2.3.1 Charakterisierung der T_{reg} Zellen

Da auch konventionelle nicht- T_{reg} $CD4^+$ Zellen nach ihrer Aktivierung vorübergehend $CD25$ exprimieren, kann dieses Oberflächenmolekül nicht als exklusiver Marker für T_{reg} Zellen betrachtet werden. Die phänotypische Charakterisierung gestaltet sich schwierig, aufgrund des Mangels an spezifischen Markern. Beim Menschen ist die Situation besonders schwierig. T_{reg} Zellen können nicht wie im murinen Modell durch die alleinige Präsenz von $CD25$, sondern nur durch ein hohes Expressionslevel dieses Oberflächenmoleküls definiert werden. So können humane $CD4^+$ Zellen in $CD25^-$, $CD25^{int}$ (oder $CD25^+$) und $CD25^{high}$ (oder $CD25^{++}$) Subpopulationen gegliedert werden, während T_{reg} Zellen zu letzteren gehören (Baecher-Allan et al. 2001, Cohen und Boyer 2006, Liu et al. 2006). Ein klarer Konsens, wo die Grenze zwischen $CD25^{int}$ und $CD25^{high}$ zu ziehen ist, existiert jedoch nicht. Besonders in klinischen Studien zu entzündlichen Prozessen, bei denen eine Vielzahl von Effektor-T-Zellen aktiviert wird, ist es schwierig, die T_{reg} Zellzahl zu bestimmen. Weiterhin werden T_{reg} Zellen durch CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) und GITR (glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor) definiert. Beide Oberflächenmarker werden jedoch gering exprimiert und lassen sich nur schwach nachweisen.

Der Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3 (FOXP3) ist zur Zeit der beste Marker für T_{reg} Zellen (Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2005). Die besondere Relevanz des intrazellulären Proteins wird durch dessen Abwesenheit deutlich. Liegt beim Menschen eine Mutation im FOXP3 Gen vor, werden keine funktionellen nT_{reg} Zellen gebildet und es manifestiert sich

eine letale Autoimmunerkrankung mit dem Namen IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) (Bennett et al. 2001, d'Hennezel et al. 2012). Als Pendant zum IPEX-Syndrom wurde die scurfy Maus beschrieben. Sie trägt eine deletierte Mutation im FOXP3 Gen und entwickelt aufgrund einer massiven CD4⁺ T-Zellinfiltration multiple Autoimmunerkrankungen (Wildin et al. 2001). Prinzipiell ist FOXP3 zur Detektion von T_{reg} Zellen gut geeignet. Der Transkriptionsfaktor kommt jedoch nur im Zellkern vor. Die Zellen müssen für den Nachweis permeabilisiert werden. Für vitale Untersuchungen oder zu therapeutischen Zwecken stehen sie anschließend nicht mehr zur Verfügung. Liu und Mitarbeiter zeigten im Mausmodell, dass die erniedrigte Expression von CD127 zur Differenzierung von T_{reg} und Effektor-T-Zellen geeignet ist (Liu et al. 2006). Während die Gruppe um Seddiki vergleichbare Ergebnisse im humanen System veröffentlichten (Seddiki et al. 2006b). Im Gegensatz dazu postulierten Simonetta und Kollegen, dass die erniedrigte CD127 Expression kein charakteristisches Merkmal von T_{reg} Zellen sei. Die unterschiedliche Expression von CD127 auf T_{reg} Zellen sei von der Lokalisation und der Aktivierung dieser Zellen abhängig (Simonetta et al. 2010). Aufgrund dessen sind weitere Studien nötig, um einen geeigneteren singulären Marker für T_{reg} Zellen zu finden.

2.3.2 Die Rolle von T_{reg} Zellen bei der GvHD

Die immunsuppressive Wirkung von T_{reg} Zellen veranlasste verschiedene Forschungsgruppen, die Bedeutung dieser Zellen im murinen Modell der allogene HSZT zu untersuchen. Die Transplantation von CD4⁺CD25^{high} T_{reg} Zellen schützte die Mäuse vor einer letalen GvHD. Denn nach adoptivem Transfer dieser regulierenden Spenderlymphozyten, reduzierte sich die Anzahl von Effektor-T-Zellen stark. Somit scheinen T_{reg} Zellen die GvH-Reaktion zu kontrollieren, indem sie die frühe Expansion alloreaktiver T-Zellen hemmen (Hoffmann et al. 2002, Taylor et al. 2002, Cohen et al. 2002). Inwieweit auch die vorteilhaften Effekte der Spender-T-Zellen beeinflusst werden, war Gegenstand weiterer Forschungen. Durch die Infusion von T_{reg} Zellen wird der gewünschte GvL-Effekt nicht abgeschwächt (Edinger et al. 2003). Das Engraftment des Stammzellpräparates wird auch nicht behindert, die hämatopoetische Rekonstitution eher gefördert (Trenado et al. 2003, Hanash und Levy 2005). Dass humane T_{reg} Zellen ebenso wie murine die Alloreaktion von Effektor-T-Zellen supprimieren, unterstützte die Vermutung, dass der Einsatz von T_{reg} Zellen auch im Menschen prophylaktische und therapeutische Bedeutung erlangen kann (Dieckmann et al. 2001, Jonuleit et al.

2001). Außerdem zeigten klinische Daten transplantierte Patienten, dass die akute GvHD mit einer reduzierten Zahl natürlicher T_{reg} Zellen verbunden ist. Schweregrad und Inzidenz korrelieren invers mit der Frequenz der CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Zellen im Transplantat (Rezvani et al. 2006, Zhai et al. 2007). Es bedarf nun der weiteren Charakterisierung humaner T_{reg} Zellen in *in vivo* Modellen, sowie künftige Auswertungen klinischer Daten, um neue Therapiestrategien zu evaluieren.

3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Bedeutung von T_{reg} Zellen auf das Therapieergebnis der allogenen HSZT im Kindesalter.

Wir bestimmten dafür die quantitative T_{reg} Zellzahl in 141 Proben von 70 Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach HSZT sowie von 17 gesunden Kindern und Jugendlichen einer ausgewählten Kontrollgruppe.

Die Daten wurden bezüglich folgender Fragestellungen untersucht:

1. Korrelieren $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen mit $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen und kann damit eine Nachweismethode, welche die therapeutische Nutzung der ermittelten Subpopulation ermöglicht, etabliert werden?
2. Wie verhält sich die T_{reg} Zellzahl transplantierte Kinder im Zeitverlauf vor und nach HSZT sowie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe?
3. Welche Faktoren nehmen unabhängig von der T_{reg} Zellzahl Einfluss auf das Therapieergebnis nach HSZT?
4. Haben T_{reg} Zellen eine Bedeutung auf das Therapieergebnis nach allogener HSZT? Nehmen T_{reg} Zellen Einfluss auf die Entwicklung einer akuten oder chronischen GvHD, auf die Entstehung eines Rezidivs der Grunderkrankung oder auf das Überleben nach HSZT? Spielt insbesondere die T_{reg} Zellzahl vor Transplantation eine Rolle für das Therapieergebnis nach HSZT?

4 Patienten, Materialien und Methoden

4.1 Patienten

Für diese Promotionsarbeit wurden 70 pädiatrische Patienten untersucht, bei denen im Zeitraum 05/1994 bis 04/2007 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena eine allogene HSZT durchgeführt wurde. Der Beobachtungszeitraum nach HSZT betrug 5 Jahre. Die zu untersuchenden Ereignisse konnten bei allen transplantierten Kindern, mit Ausnahme der im Beobachtungszeitraum verstorbenen Patienten, über die gesamten 5 Jahre erfasst werden.

Das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt der HSZT lag bei 12 Jahren und 6 Monaten (10 Monate bis 22 Jahre). Bei den 30 Mädchen (42,9 %) und 40 Jungen (57,1 %) stellten verschiedene Grunderkrankungen die Indikation zur HSZT dar. Der Großteil mit 34 von 70 Patienten (48,6 %) wurde mit der Diagnose einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) transplantiert, bei 14 von 70 Patienten (20%) stand eine akute myeloische Leukämie (AML) im Vordergrund. 5 von 70 Patienten (7,1 %) litten an einer chronischen myeloischen Leukämie (CML), 14 von 70 (20 %) an einem myelodysplastischen Syndrom (MDS) und 3 von 70 (4,3 %) an einer schweren aplastischen Anämie (SAA) (siehe Abbildung 4.1).

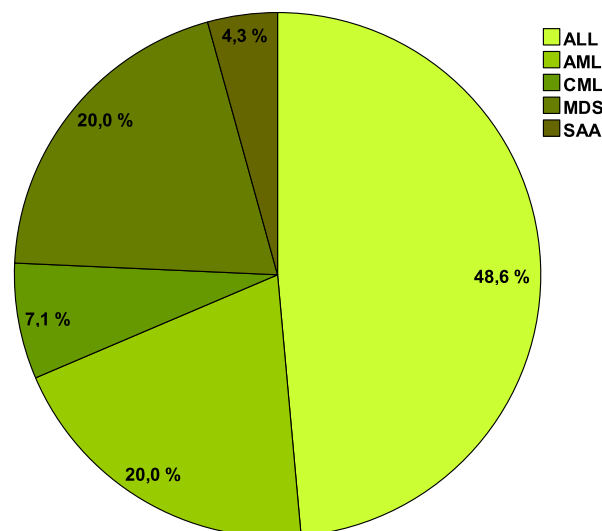


Abb. 4.1: Diagnose bei Transplantation. ALL - akute lymphoblastische Leukämie, AML - akute myeloische Leukämie, CML - chronische myeloische Leukämie, MDS - myelodysplastisches Syndrom, SAA - schwere aplastische Anämie.

Die Konditionierung beinhaltete die Gabe von Chemotherapeutika, teilweise gekoppelt mit fraktionierter Ganzkörperbestrahlung. Sie erfolgte in allen Fällen myeloablativ. Tabelle 4.1 zeigt welche Chemotherapeutika verwendet wurden.

Tab. 4.1: Konditionierung

Konditionierung	Patientenzahl (absolut)	Patientenzahl (%)
BU CY	4	5,7
BU CY ATG	3	4,3
BU CY MEL	4	5,7
BU CY MEL ATG	14	20,0
BU CY TT ATG	3	4,3
BU CY TT OKT3 PRED	1	1,4
BU CY VP16	2	2,9
BU CY VP16 ATG	1	1,4
BU VP16 TT ATG	1	1,4
CY ATG	1	1,4
CY FLU CAM	1	1,4
TBI VP16	10	14,3
TBI VP16 ATG	17	24,3
TBI CY ATG	4	5,7
TBI CY MEL ATG	1	1,4
TBI VP16 TT ATG	2	2,9
TT FLU ATG	1	1,4

ATG - Antithymozytenglobulin, BU - Busulfan, CAM - Campath®, CY - Cyclophosphamid, FLU - Fludarabin, MEL - Melphalan, OKT3 - Muromonab-CD3, PRED - Prednison, TBI - Ganzkörperbestrahlung, fraktioniert (engl. total body irradiation), TT - Thiotepa, VP16 - Vepesid®.

Die Transplantation wurde bei 38 Patienten (54,3 %) mit Knochenmark und bei 30 Patienten (42,9 %) mit PBSZ durchgeführt. Dabei wurden sowohl unselektionierte PBSZ, sowie CD34⁺ selektionierte PBSZ, als auch die Kombination aus beiden verwendet. Bei jeweils einem Patienten wurden die Stammzellen aus Nabelschnurblut gewonnen (1,4 %) beziehungsweise Knochenmark kombiniert mit CD34⁺ selektierten PBSZ (1,4 %) transplantiert. Das Transplantationsmaterial stammte bei 19 Patienten (27,1 %) von HLA-identischen

Verwandten. Bei 5 Patienten (7,1 %) wurde auf einen verwandten haploidentischen bzw. teilidentischen Spender zurückgegriffen. Für den Großteil mit 41 Patienten (58,6 %) wurde ein HLA-kompatibler Fremdspender gefunden. Fünf Patienten (7,1 %) wurde nicht-HLA-identisches Material von Fremdspendern transplantiert. Die Spender waren zu 31,4 % weiblich (22 von 70) und zu 68,6 % männlich (48 von 70).

Die Einteilung von akuter und chronischer GvHD erfolgte nach Standardkriterien (Glucksberg et al. 1974, Ratanatharathorn et al. 2001).

Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über alle erhobenen Patientencharakteristika und gliedert in Patienten mit stattgehabter akuter GvHD und Patienten, welche nicht an der akuten Form der GvHD erkrankten.

Tab. 4.2: Patientencharakteristika

	Keine aGvHD (Grad 0)	aGvHD (Grad 1 bis 4)	Gesamt
Anzahl (n)	36	34	70
Alter			
Median (min. – max.) in Jahren	11,5 (1 – 22)	12,0 (0 – 22)	12,0 (0 – 22)
n < 12 Jahre / n ≥ 12 Jahre	18 / 18	14 / 20	32 / 38
Geschlecht			
weiblich	15	15	30
männlich	21	19	40
Diagnosen			
ALL	21	13	34
AML	7	7	14
CML	2	3	5
MDS	3	11	14
SAA	3	0	3
Konditionierung			
Chemotherapie	16	20	36
TBI + Chemotherapie	20	14	34
Stammzellquelle			
PBSZ	9	10	19

CD34 ⁺ selektionierte PBSZ	2	6	8
PBSZ + CD34 ⁺ PBSZ	1	2	3
Knochenmark	22	16	38
Knochenmark + CD34 ⁺ PBSZ	1	0	1
Nabelschnurblut	1	0	1
Spender			
verwandt	11	13	24
nicht-verwandt	25	21	46
Gewebeverträglichkeit			
HLA-identisch / -kompatibel	33	26	59
nicht HLA-identisch	3	8	11
Geschlechterübereinstimmung			
ja (mm / ww)	23 (18 / 5)	18 (12 / 6)	41 (30 / 11)
nein (mw / wm)	13 (3 / 10)	16 (7 / 9)	39 (10 / 19)
Grad der akuten GvHD			
Grad I	-	16	16
Grad II	-	14	14
Grad III	-	2	2
Grad IV	-	2	2
Grad der chronischen GvHD			
keine cGvHD	33	23	56
cGvHD (extendiert / limitiert)	3 (3 / 0)	11 (10 / 1)	14 (13 / 1)
Rezidiv			
ja	7	6	13
nein	29	28	57
Überleben			
ja	22	21	43
nein	14	13	27

aGvHD - akute GvHD, cGvHD - chronische GvHD, n - Anzahl, min. - Minimum, max. - Maximum, ALL - akute lymphoblastische Leukämie, AML - akute myeloische Leukämie, CML - chronische myeloische Leukämie, MDS - myelodysplastisches Syndrom, SAA - schwere aplastische Anämie, TBI - Ganzkörperbestrahlung (fraktioniert), PBSZ - periphere Blutstammzellen, m - männlich, w - weiblich.

4.2 Materialien

Zur Verfügung standen 141 Probenmaterialien von 70 Patienten. Es wurden in flüssigem Stickstoff kryokonservierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMNZ) untersucht. Diese wurden mittels Ficolltrennung aus peripherem Blut gewonnen. Das Blut wurde zu einem Zeitpunkt vor Transplantation (n = 41), am Tag 30 (n = 33), am Tag 60 (n = 34) sowie am Tag 100 (n = 33) nach HSZT entnommen.

Die Blutentnahme vor Transplantation erfolgte im Median 28 Tage vor der HSZT (minimal 8 Tage vor HSZT, maximal 39 Tage vor HSZT). Material für die Untersuchung von Tag 30 wurde frühestens am Tag 21, spätestens am Tag 38 nach Transplantation entnommen, im Median 28 Tage nach HSZT. In die Gruppe Tag 60 wurden Blutentnahmen zwischen Tag 56 und Tag 64 nach HSZT eingeschlossen, im Median erfolgte sie 60,5 Tage nach HSZT. In die Materialauswahl für den Tag 100 wurden Proben von Tag 97 bis Tag 148 aufgenommen, die mediane Blutentnahme erfolgte 102 Tage nach HSZT.

4.2.1 Geräte und Reagenzien

Verwendete Reagenzien und Geräte sind in den Tabellen 4.3 und 4.4 erfasst.

Tab. 4.3: Zusammenstellung der verwendeten Reagenzien mit Hersteller

Reagenz	Hersteller
ISOTON [®] II Diluent	Beckman Coulter
Fixierungs-/ Permeabilisierungskonzentrat	eBioscience
Fixierungs-/ Permeabilisierungsverdünner	eBioscience
Permeabilisierungspuffer	eBioscience
Aqua dest.	Braun

Tab. 4.4: Zusammenstellung der verwendeten Geräte mit Hersteller

Geräte	Hersteller
Vortexer	Scientific Industries
Waschzentrifuge	Serocent Baxter
Durchflusszytometer	Beckman Coulter XL-MCL

5 ml Tubes (Messröhrchen)	BioOne
Pipette, Multipipette	Socorex
Einmalpipettenspitzen	BioOne
Spritzen 10ml	Braun
Kryoröhrchen 2 ml	BioOne

4.2.2 Antikörper

Die Auflistung der verwendeten Antikörper mit deren Markierung, Klon, Isotyp und Hersteller folgt in den Tabellen 4.5, 4.6 und 4.7.

Tab. 4.5: Verwendete Antikörper für die Oberflächenfärbung

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Hersteller
CD4	ECD	T4	IgG1	Beckman Coulter
CD25	PE-Cy5	M-A251	IgG1	BD
CD127	PE	R34.34	IgG1	Beckman Coulter

Tab. 4.6: Verwendete Antikörper für die intrazelluläre Färbung

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Herkunft
Anti-human FOXP3	Alexa Flour [®] 488	PCH101	Rat IgG2a	eBioscience

Tab. 4.7: Verwendete Antikörper für die Isotypenkontrolle

Antikörper	Markierung	Klon	Isotyp	Herkunft
Isotyp	Alexa Flour [®] 488	n.a.	Rat IgG2a	eBioscience
Isotyp	PE	679.1Mc7	IgG1	Beckman Coulter
Isotyp	PE-Cy5	679.1Mc7	IgG1	Beckman Coulter

4.3 Methoden

4.3.1 Durchflusszytometrie

4.3.1.1 Grundlagen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können einzelne Zellen aufgrund ihrer Form, Struktur und Färbung unterschieden und somit charakterisiert werden. Das Prinzip der Analyse beruht auf der Emission optischer Signale seitens der Zelle, wenn diese, umgeben von einem dünnen Flüssigkeitsstrom, fokussierte Laserstrahlen unterschiedlicher Anregungswellen passiert. Durch Streuung des Lichts in verschiedene Richtungen erhält man unterschiedliche Informationen. Das Vorwärtstreulicht (engl. forward scatter, FS) hängt von der Größe einer Zelle ab, das Seitwärtstreulicht (engl. side scatter, SS) von der Granularität. Durch diese Auswertung können bereits die wichtigsten Untergruppen der weißen Blutkörperchen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) unterscheiden werden. Es ist des Weiteren möglich, Zelltrümmer und tote Zellen von lebenden abzugrenzen. Die Markierung der Zellen mit fluorochromgekoppelten monoklonalen Antikörpern ermöglicht es, eine Vielzahl weiterer Merkmale zu analysieren und damit verschiedene Zellpopulationen zu trennen. Jedes Fluorochrom absorbiert und emittiert das Licht bei einer bestimmten Wellenlänge besonders stark. Der Einsatz von Filtern ermöglicht die Verwendung von Farbstoffen, welche, durch das gleiche Laserlicht angeregt, nah beieinander liegende Wellenlängen emittieren (Rothe 2007).

4.3.1.2 Durchführung

Für die Durchflusszytometrie wurden 1×10^6 mononukleäre Zellen verwendet, gewonnen durch Ficolltrennung aus peripher entnommenem Blut und kryokonserviert für eine spätere Analyse.

Die Proben wurden sofort nach Entnahme aus den mit flüssigem Stickstoff gefüllten Containern unter lauwarmem Wasser aufgetaut. Das Material wurde in 5 ml Tubes überführt und in der Zentrifuge mit 3,0 ml Isoton[®] II im Waschprogramm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 200 µl Isoton[®] II resuspendiert und auf dem Vortexer sorgfältig aufgeschüttelt. Um sowohl einen Test, als auch eine Kontrolle durchführen zu können, wurde das Material in zwei 5 ml Tubes mit jeweils 100 µl aufgeteilt. Es folgte

anschließend die Zugabe der fluorochrommarkierten Antikörper für die Oberflächenfärbung. Für den Test wurden die Zellen mit 5 µl CD4-ECD, 15 µl CD25-PECy5 und 15 µl CD127-PE inkubiert. Zur Kontrolle wurden 5 µl PECy5 Kontrolle und 5 µl PE Kontrolle und 5 µl CD4-ECD hinzugefügt. Nach gründlichem Aufschütteln und 15 minütiger Inkubation wurden die Proben mit 3,0 ml Isoton[®] II in der Zentrifuge im Waschprogramm gewaschen.

Es folgte die Vorbereitung der oberflächengefärbten Zellen auf die intrazelluläre Färbung. Dafür wurden aus dem FOXP3-Kit nach Herstellerangaben eine Fixierungs-/Permeabilisierungslösung sowie ein Permeabilisierungspuffer in erforderlicher Menge frisch präpariert. Nun wurde das Material mit 1 ml der Fixierungs-/Permeabilisierungslösung auf dem Vortexer aufgeschüttelt und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 2 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen. Ein erneutes Waschen erfolgte in der Waschzentrifuge mit 3,0 ml Isoton[®] II im Waschprogramm. Nach der Zugabe von 20 µl FOXP3-Alexa[®] Fluor 488 Antikörper bzw. 20 µl Isotypenkontrolle und Aufschütteln auf dem Vortexer wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die aufgearbeiteten Proben wurden anschließend erneut mit 2 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden sie mit 300 µl Isoton[®] II aufgefüllt. Wir verwendeten ein Beckman Coulter XL-MCL Durchflusszytometer mit der Beckman Coulter System II Software. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Beckman Coulter Expo 32 Software.

4.3.1.3 Auswertung der Daten mit der Expo 32 Software

Zunächst wurde die Lymphozytenpopulation im forward scatter und side scatter eingegrenzt (Lymphozytengate) und daraus die CD4⁺ Zellen isoliert (Abb. 4.2 A und B). Anschließend konnten verschiedene Lymphozytensubpopulationen durch die Expression von Oberflächmolekülen mit Hilfe monoklonaler Antikörper dargestellt und ihr prozentualer Anteil quantifiziert werden (Abb. 4.2 C und D). Diese markierten Populationen konnten eingegrenzt werden, so dass eine detaillierte Analyse ausschließlich dieser Zellen möglich war.

Anhand der Abbildung 4.2 D soll die Datenauswertung beispielhaft erklärt werden. Im oberen linken Quadranten des Punktdiagramms sind dabei die CD4⁺, im oberen rechten Quadranten die CD4⁺FOXP3⁺ (doppelpositiven) und im unteren rechten Quadranten die FOXP3⁺ Zellen dargestellt. Die Gesamtzahl der CD4⁺ Zellen ergibt sich aus der Addition der beiden oberen

Quadranten, die Gesamtzahl der FOXP3⁺ Zellen aus der Addition der beiden rechten Quadranten. Die Gesamtzahl aller Zellen ergibt sich aus der Addition aller Quadranten und entspricht dem Bereich z aus der Abb 4.2 C.

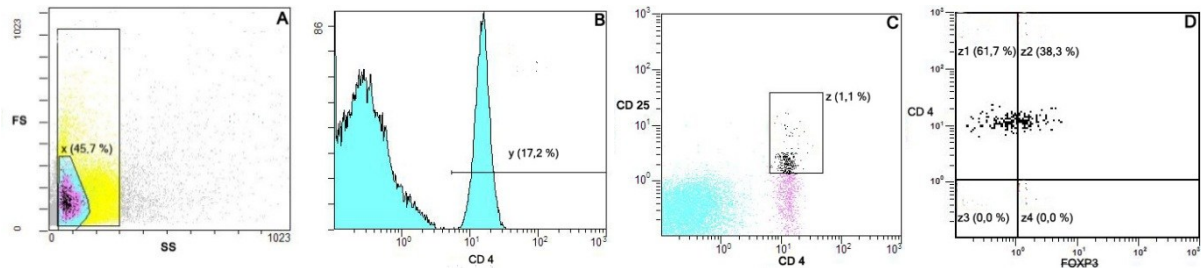


Abb. 4.2: Vorgehen bei der Auswertung der im Durchflusszytometer gemessenen Daten. Abb. A zeigt den forward (FS) und side scatter (SS), indem zunächst die Lymphozytenpopulation eingegrenzt wurde (Bereich x, Lymphozytengate). Anschließend erfolgte die Isolation der Lymphozyten durch Trennung der CD4⁺ von den CD4⁻ Zellen (Abb. B, Bereich y). Die in Abb. C durch den Bereich z markierten CD4⁺CD25⁺ Zellen konnten im Folgenden in FOXP3⁺ und FOXP3⁻ Zellen unterteilt werden (Abb. D).

4.3.2 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics (Version 19) durchgeführt. Der Effekt von möglichen Einflussfaktoren auf das Therapieergebnis wurde mittels Chi²-Test analysiert. Der Beobachtungszeitraum für alle Ereignisse betrug 5 Jahre nach HSZT bei allen Patienten. Es wurden die erwarteten Häufigkeiten und deren signifikante Unterschiede für Patienten mit und ohne akute GvHD, mit und ohne chronische GvHD, mit und ohne Rezidiv sowie für im Beobachtungszeitraum überlebende und verstorbene Patienten geprüft. Lag die erwartete absolute Häufigkeit unter 5, wurde der exakte Test nach Fischer verwendet. Die statistische Auswertung des Einflusses der T_{reg} Zellen auf das Therapieergebnis erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben. Die Korrelation der unterschiedlichen Messmethoden zur Quantifizierung der T_{reg} Zellen wurde mit dem Intraklassenkorrelationskoeffizienten nach Lin (IKK_{Lin}) berechnet. Die Ergebnisse sind als Boxplots, Streudiagramme und Residuenplots nach Bland und Altman dargestellt. Als ein statistisch signifikanter Unterschied wurde $p < 0,05$ angesehen.

4.3.2.1 Boxplots

Die grüne Box repräsentiert die 50 % mittleren Werte. Dies sind Werte zwischen dem 25 % und dem 75 % Perzentil. Der Median (50 % Perzentil) wird durch den schwarzen Strich innerhalb der Box dargestellt. Die horizontal verlaufenden Striche über und unter der Box kennzeichnen den größten und den kleinsten Wert, der nicht als extremer Wert oder als Ausreißer klassifiziert wird. Ausreißer werden durch kleine Kreise, extreme Werte durch Dreiecke dargestellt. Als Ausreißer werden Werte definiert, deren Abstand zum 25 % bzw. 75 % Perzentil zwischen dem 1,5 bis 3 fachen der Boxhöhe liegt. Bei extremen Werten ist der Abstand größer als das 3 fache der Boxhöhe.

4.3.2.2 Intraklassenkorrelation nach Lin

Die Intraklassenkorrelation ist ein parametrisches statistisches Verfahren zur Quantifizierung der Übereinstimmung zwischen mehreren Beurteilern in Bezug auf mehrere Beobachtungsobjekte. Das dazugehörige Maß, der Intraklassenkorrelationskoeffizient nach Lin setzt intervallskalierte Daten voraus und wird in der Regel berechnet, wenn mehrere Beobachter bzw. Messmethoden miteinander verglichen werden sollen.

Der IKK_{Lin} kann wie bei anderen Korrelationskoeffizienten Werte zwischen -1,0 und +1,0 annehmen. Reliabilitätsmaße beschränken sich jedoch definitionsgemäß auf einen Wertebereich von 0 bis 1, damit indiziert ein negativer Wert eine Reliabilität von 0.

Im Streudiagramm graphisch dargestellt, bedeutet der IKK_{Lin} die Abweichung der Regressionsgeraden der Messwerte von der Winkelhalbierenden (Guggenmoos-Holzmann und Wernecke 1996).

4.3.2.3 Residuenplot nach Bland und Altman

Die graphische Ergebnispräsentation als residuenartige Darstellung nach Bland und Altman ergänzt das einfache Streudiagramm und den IKK_{Lin} . Der Residuenplot ermöglicht eine optische Beurteilung von systematischen und / oder großen Abweichungen. Es werden die einzelnen Messwertdifferenzen beider Messmethoden in Abhängigkeit von den über beide Messmethoden gemittelten Messwerten als Streudiagramm dargestellt. Zur Interpretation werden drei Linien eingezeichnet: der Mittelwert der Differenzen, sowie der Mittelwert der

Differenzen plus bzw. minus der doppelten Standardabweichung. In diesem Bereich liegen mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 95 % die Abweichungen individueller Messwerte (Guggenmoos-Holzmann und Wernecke 1996, Bland und Altman 1986).

5 Ergebnisse

5.1 Korrelation $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen

Neben der Erforschung von Funktion und klinischem Nutzen der T_{reg} Zellen ist deren Nachweis ein Schwerpunkt aktueller Studien. Es gibt keinen klaren Konsens in der phänotypischen Markierung dieser T-Zellsubpopulation. Der zurzeit beste Marker für T_{reg} Zellen ist FOXP3. Jedoch müssen die Zellen für den Nachweis dieses intrazellulären Moleküls permeabilisiert werden. Danach stehen sie für weitere Untersuchungen oder zu therapeutischen Zwecken nicht mehr zur Verfügung. Ein exklusiver Marker, der den Einsatz von T_{reg} Zellen in der Praxis ermöglicht, wurde noch nicht gefunden. Indes wird die Möglichkeit, T_{reg} Zellen mit Hilfe des Oberflächenmoleküls CD127 nachzuweisen, kontrovers diskutiert.

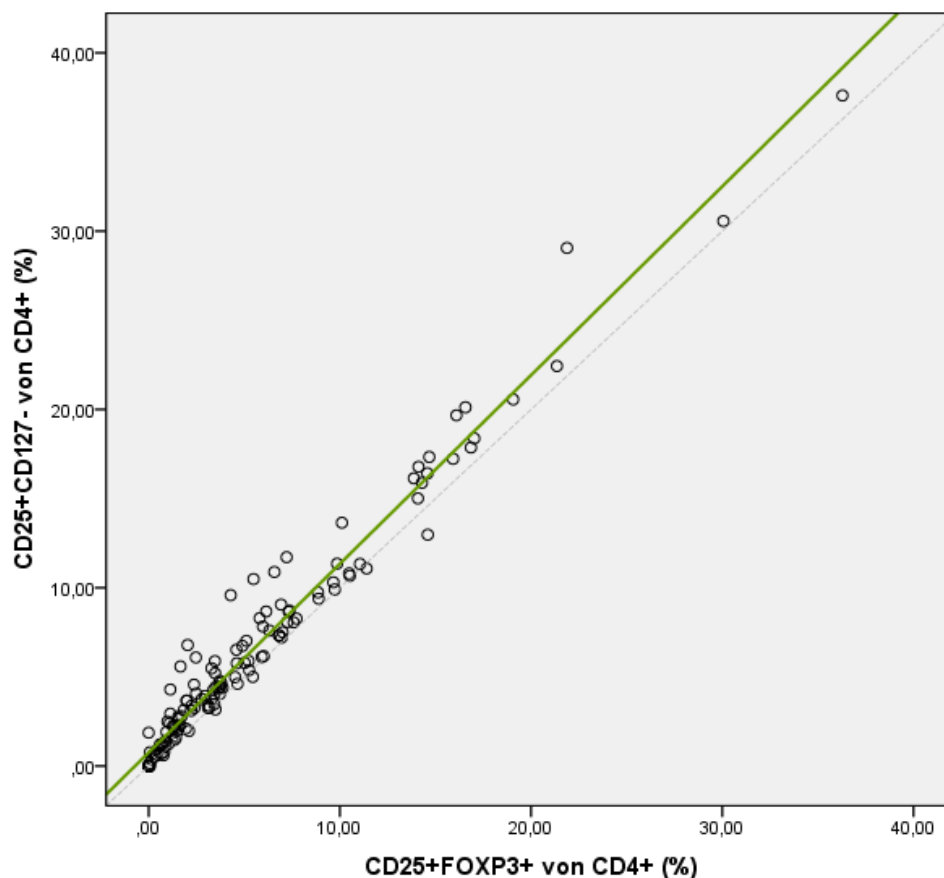


Abb. 5.1: Korrelation $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen im Streudiagramm. Regressionsgerade und Winkelhalbierende liegen nah beieinander. Grün - Regressionsgerade, grau gestrichelt - Winkelhalbierende ($y = x$).

Wir bestimmten sowohl die $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ als auch die $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen in allen 141 zur Verfügung stehenden Proben. Die Darstellung im Streudiagramm (siehe Abb. 5.1) zeigt einen sehr nah beieinanderliegenden Verlauf der Regressionsgeraden, welche durch die beobachtete Punktwolke gezogen wurde, und der Winkelhalbierenden. Ebenfalls zeigt die residuenartige Darstellung nach Bland und Altman (siehe Abb. 5.2) eine hohe Korrelation der zwei Untersuchungsmethoden. Die Werte streuen gleichmäßig um den Mittelwert der Differenz aus $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen, nur vereinzelte Werte liegen außerhalb der Standardabweichung. Zur Quantifizierung der Korrelation beider Messmethoden wurde das parametrisch statistische Verfahren der Intraklassenkorrelation nach Lin durchgeführt. Der IKK_{Lin} zeigte hier eine signifikant hohe Korrelation mit einem Wert von 0,965.

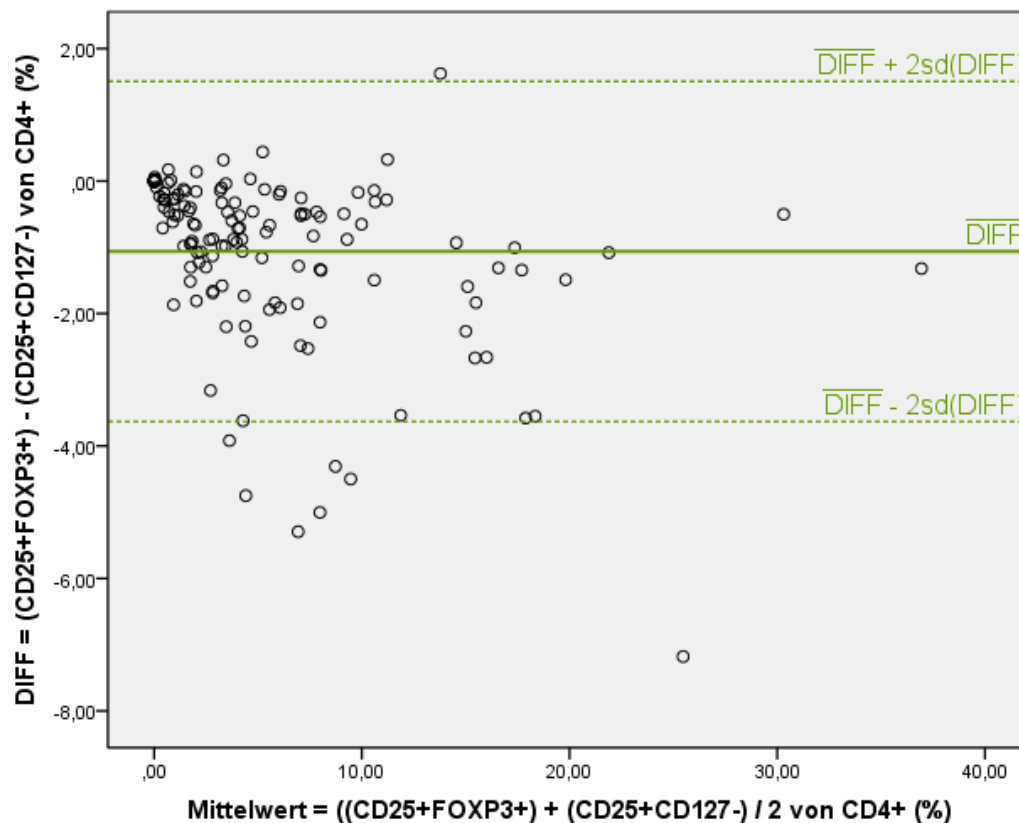


Abb. 5.2: Residuenartige Darstellung nach Bland und Altman zur Darstellung der Korrelation von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen. DIFF - Differenz, \overline{DIFF} - Mittelwert der Differenz, sd - Standardabweichung.

5.2 Quantitativer Nachweis der T_{reg} Zellen

T_{reg} Zellen sind für die Toleranzentwicklung gegenüber Auto- und Alloantigenen von großer Bedeutung. Aufgrund immunsuppressiver Eigenschaften spielt die Erforschung dieser T-Zell-Subpopulation eine wichtige Rolle. Um den Einfluss der T_{reg} Zellen auf die allogene HSZT im Kindesalter näher charakterisieren zu können, erfolgte ein quantitativer Nachweis der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie. Das Probenmaterial wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Transplantation entnommen. Die angegebenen Zellzahlen sind relativ und beziehen sich auf alle CD4⁺ Lymphozyten. Die Angabe erfolgte in Prozent.

Die Abbildung 5.3 zeigt die T_{reg} Zellzahl im Zeitverlauf. Zur Untersuchung des Zeitpunktes vor Transplantation standen Proben von 41 Patienten zur Verfügung. Die mediane T_{reg} Zellzahl der Patientengruppe betrug zum Zeitpunkt vor HSZT 0,93 %. Es wurden Werte zwischen 0 % (Minimum) und 7,21 % (Maximum) gemessen. Zum Zeitpunkt Tag 30 nach HSZT wurden Proben von 33 Patienten untersucht. Die mediane T_{reg} Zellzahl transplanteder Kinder lag bei 2,94 %, das Minimum betrug 0 %, das Maximum 21,88 %. Die Analyse der Proben von 34 Patienten am Tag 60 nach HSZT erbrachte einen Median von 5,35 %, ein Minimum von 0 % und ein Maximum von 36,29 %. Am Tag 100 nach HSZT konnten 33 Patientenproben ausgewertet werden. Zu diesem Zeitpunkt betrug die mediane T_{reg} Zellzahl 5,97 %. Die Werte lagen zwischen 0,39 % und 17,03 %.

Die Analyse der medianen T_{reg} Zellzahl aller Patienten zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg im Zeitverlauf. Die mediane T_{reg} Zellzahl war vor Transplantation signifikant niedriger als zu jedem Zeitpunkt nach Transplantation. Auch der Vergleich der Werte vor HSZT mit allen Werten nach HSZT ergab einen statistisch höchst signifikanten Unterschied ($p < 0,001$). Ebenso waren die CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen am Tag 30 signifikant niedriger als am Tag 60 sowie 100. Zwischen der T_{reg} Zellzahl am Tag 60 und 100 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied erhoben werden ($p = 0,90$).

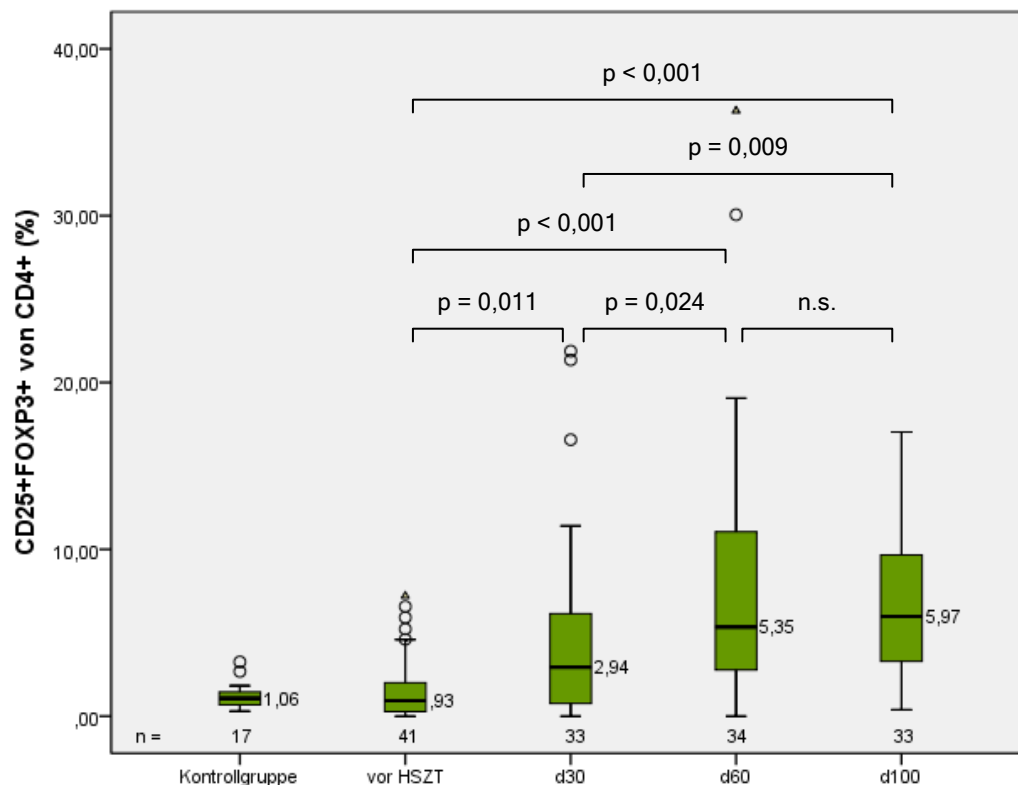


Abb. 5.3: Quantitativer Nachweis der T_{reg} Zellen aller transplantierten Patienten im Zeitverlauf sowie der Kontrollgruppe. Die mediane T_{reg} Zellzahl stieg im Zeitverlauf statistisch signifikant an. Angegeben sind Median und Patientenzahl (n) für den jeweiligen Zeitpunkt zur HSZT sowie die Signifikanz (p). Ausreißer sind mit o gekennzeichnet, extreme Werte werden durch Δ dargestellt. n.s. - nicht signifikant.

5.2.1 Vergleich der T_{reg} Zellzahl mit einer Kontrollgruppe

Um zu überprüfen, ob sich die T_{reg} Zellzahl transplantierten Patienten von der Normalbevölkerung unterscheidet, erfolgte der Nachweis $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen ebenfalls für eine Kontrollgruppe. Diese umfasste 17 Kinder im Alter von 5 bis 14 Jahren (medianes Alter 8 Jahre; 7 weiblich, 10 männlich), welche aufgrund eines elektiven Eingriffes (Schieloperation) in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena stationär aufgenommen wurden. Sie waren alle frei von Fieber und Infekten. Sie litten nicht an einer malignen Grunderkrankung. Im Rahmen der präoperativen Blutentnahme wurde eine 10 ml Blutprobe zu Studienzwecken entnommen. Dafür lag das Einverständnis der Sorgeberechtigten vor. Die Proben der Kontrollgruppe wurden ebenso wie die der Patientengruppe aufbereitet und kryokonserviert.

Die mediane T_{reg} Zellzahl der Kontrollgruppe betrug 1,06 %. Es wurden Werte zwischen 0,30 (Minimum) und 3,25 % (Maximum) gemessen. Die Korrelation der relativen T_{reg} Zellzahl zwischen Kontroll- und Patientengruppe ist in Abbildung 5.4 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden sich im peripheren Blut transplantierte Kinder signifikant mehr $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen. Zum Zeitpunkt vor HSZT konnte zwischen Kontroll- und Patientengruppe kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,74$).

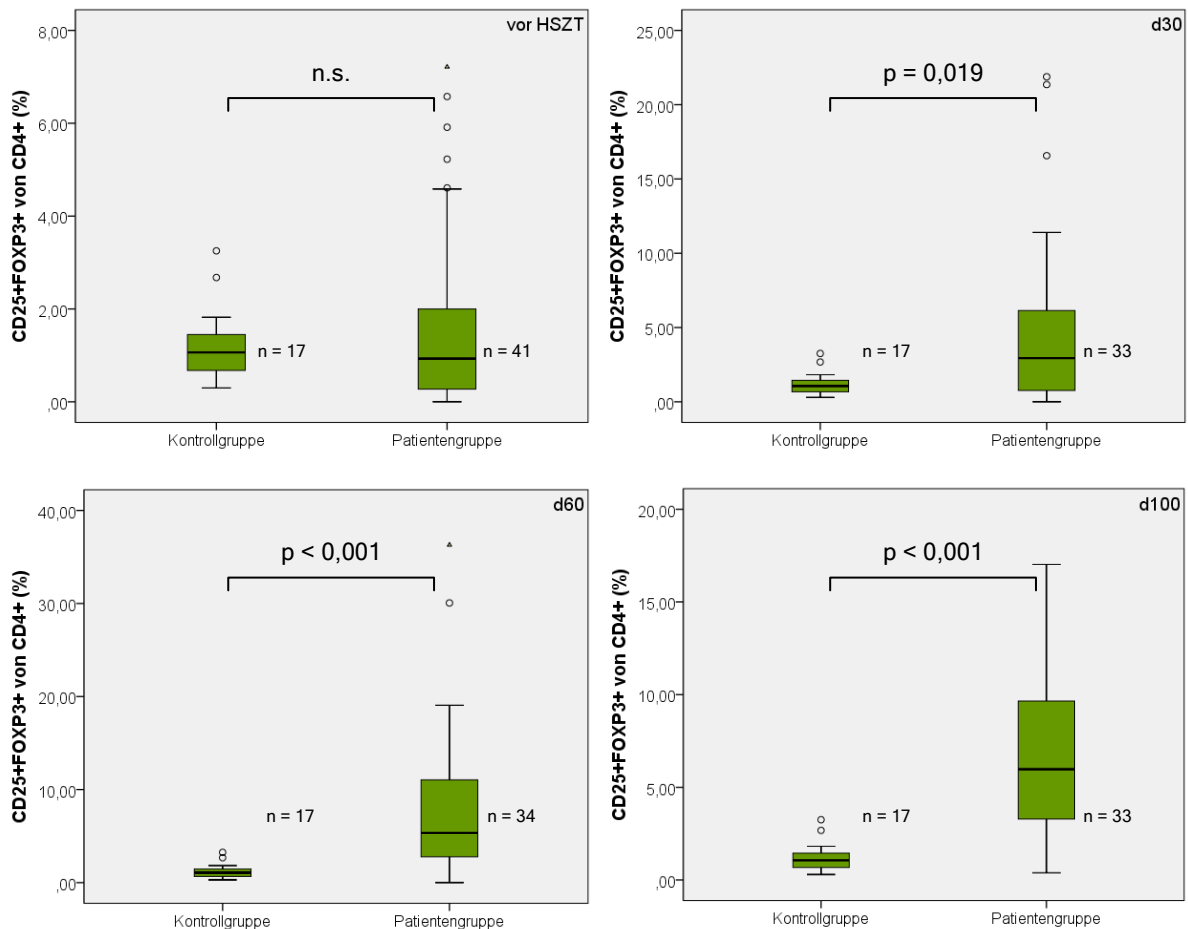


Abb. 5.4: Vergleich der T_{reg} Zellzahl der Kontrollgruppe mit der Patientengruppe zum Zeitpunkt vor HSZT und an den Tagen 30, 60 sowie 100 nach HSZT. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der relativen $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellzahl der Kontroll- und der Patientengruppe zum Zeitpunkt vor HSZT. Aber zu allen Zeitpunkten nach HSZT war die $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellzahl der Patientengruppe verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Angegeben sind Patientenzahl (n) und die Signifikanz (p). Ausreißer sind mit o gekennzeichnet, extreme Werte werden durch Δ dargestellt. n.s. - nicht signifikant.

5.3 Analyse des Therapieergebnisses unabhängig von T_{reg} Zellen

Um Aussagen über das Therapieergebnis zu treffen, ermittelten wir die Inzidenzen der akuten und der chronischen GvHD sowie die des Rezidivs, ebenso die Zahl der im Beobachtungszeitraum verstorben Patienten. Es folgte eine Analyse der möglichen Einflussfaktoren wie Alter und Geschlecht der Patienten, Grunderkrankung, Konditionierungsregime, verwendete Stammzellquelle, HLA-Kompatibilität, Familien- oder Fremdspende und Geschlechterdiskrepanz.

5.3.1 Akute GvHD

Die häufigste Komplikation nach einer HSZT ist die GvHD. Eine akute GvHD manifestiert sich innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation. 34 unserer 70 Patienten (48,6 %) entwickelten solch eine akute GvHD. Der früheste Diagnosezeitpunkt war Tag 15 nach HSZT, der späteste Tag 99, als medianer Zeitpunkt wurde Tag 43 ermittelt. Abbildung 5.5 zeigt die Schwere der akuten GvHD. Die Gradeinteilung erfolgte nach Glucksberg (Glucksberg et al. 1974).

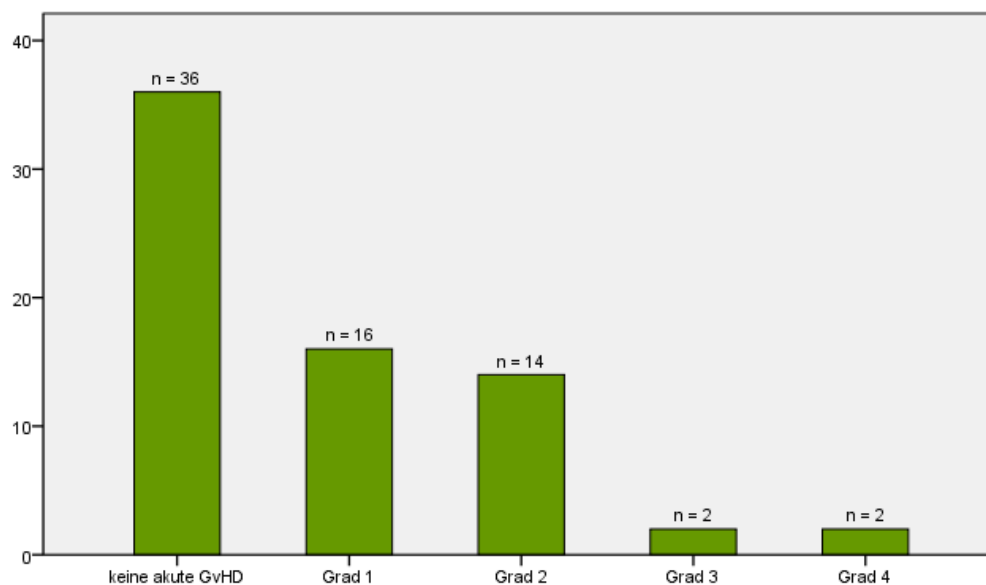


Abb. 5.5: Verteilung der klinischen Grade der akuten GvHD nach Glucksberg. Angegeben ist die Patientenzahl (n) für den jeweiligen Schweregrad der akuten GvHD.

Patienten, welche keine akuten GvHD entwickelten, waren im Median 11,5 Jahre alt (Minimum 13 Monate, Maximum 22 Jahre). Patienten, die an der akuten GvHD erkrankten, hatten zum Transplantationszeitpunkt ein medianes Alter von 12,0 Jahren (Minimum 10 Monate, Maximum 22 Jahre). 14 der 32 Kinder unter 12 Jahren (43,8 %) sowie 20 von 38 der 12 jährigen und älteren Kinder (52,6 %) erkrankten an der akuten GvHD ($p = 0,74$). Damit zeigte sich, dass Kinder ohne akute GvHD nicht signifikant jünger waren, als Kinder, welche eine akute GvHD entwickelten ($p = 0,46$).

15 der 30 Mädchen (50 %) und 19 der 40 Jungen (47,5 %) erkrankten an einer akuten GvHD. Mittels des χ^2 Tests wurde nachgewiesen, dass sich die Inzidenz der akuten GvHD bei Mädchen und Jungen nicht signifikant voneinander unterschied ($p = 0,84$).

Wir analysierten ebenfalls, ob die Grunderkrankung einen statistisch signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung einer akuten GvHD darstellte. 13 von 34 Patienten mit ALL, 7 von 14 Patienten mit AML, 3 der 5 Kinder mit CML und 11 der 14 Kinder mit MDS entwickelten im Verlauf eine akute GvHD. Kein Kind der insgesamt 3 Patienten, welche aufgrund einer SAA transplantiert wurden, erkrankte an der akuten Form der GvHD. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen wurde der χ^2 Test nur für Patienten mit ALL und AML durchgeführt. Unter den Patienten, welche aufgrund einer ALL transplantiert wurden, erkrankten 13 von 34 Kindern (38,2 %) an einer akuten GvHD. Bei 7 von 14 AML-Patienten (50,0 %) wurde eine akute GvHD diagnostiziert. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied erhoben werden ($p = 0,45$).

Eine akute GvHD wurde bei 20 von 36 mittels Chemotherapie (55,6 %) und bei 14 von 34 mittels einer Kombination aus Chemotherapie und fraktionierter Ganzkörperbestrahlung konditionierten Patienten (41,2 %) dokumentiert. Die Inzidenz der Gruppen unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,23$).

In der vorliegenden Arbeit stellten bestimmte Eigenschaften des Transplantats keine statistisch signifikanten Risikofaktoren für die Entwicklung einer akuten GvHD dar. 10 von 19 Kindern entwickelten unter der Verwendung von PBSZ (52,6 %) eine akute GvHD. 8 Kinder erhielten ein $CD34^+$ selektionsiertes PBSZ-Transplantat, davon erkrankten 6 Kinder an einer akuten GvHD (75,0 %). Ebenso erkrankten 2 von 3 Patienten, welchen eine Kombination aus $CD34^+$ selektionierten und konventionellen unselektionierten PBSZ

transplantiert wurde (66,7 %), an der akuten GvHD. 16 von 38 Knochenmarktransplantierte Kinder zeigten das klinische Bild einer akuten GvHD (42,1 %). Ein Patient erhielt sowohl Knochenmark als auch CD34⁺ selektionierte PBSZ, einem Kind wurden Stammzellen aus Nabelschnurblut transplantiert, beide erkrankten nicht an einer akuten GvHD. Unter Ausschluss der beiden letztgenannten Patienten (aufgrund der geringen Fallzahl) und Zusammenfassung selektionierter und unselektionierter Stammzellspenden konnte im Chi² Test kein statistisch signifikanter Unterschied der Inzidenz der akuten GvHD bei der Verwendung von PBSZ im Vergleich zu Knochenmarktransplantierten Patienten erhoben werden ($p = 0,14$). Von 24 Kindern, die Stammzellen von einem Familienmitglied erhielten, entwickelten 13 eine akute GvHD (54,2 %). Stammte das Transplantat von einem Fremdspender, erkrankten 21 von 46 Kindern an einer akuten GvHD (45,7 %). Auch hier unterschied sich die Inzidenz der Gruppen nicht signifikant ($p = 0,50$). Unter der Verwendung von HLA-identischen Transplantaten entwickelten 26 von 59 Patienten eine akute GvHD (44,1 %). Im Gegensatz dazu zeigten 8 von 11 nicht HLA-identisch (teilidentisch oder haploidentisch) transplantierte Patienten eine akute Form der GvHD (72,7 %). Die Inzidenz der akuten GvHD war bei nicht HLA-identischen Transplantationen tendenziell erhöht, dieser Unterschied war hier jedoch nicht signifikant ($p = 0,088$). Zuletzt wurde der Einfluss der Geschlechterübereinstimmung auf die akute GvHD überprüft. Dabei entwickelten 18 von 41 Patienten (43,9 %) deren Geschlecht mit dem ihres Spenders übereinstimmte eine akute GvHD, während 16 von 29 Patienten (55,2 %) ohne Übereinstimmung der Geschlechter an einer akuten GvHD erkrankten. Erneut konnte kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden ($p = 0,35$). Differenziert man jedoch zwischen männlichen Empfängern, welche einen weiblichen Spender hatten, und allen anderen Patienten, zeigt sich tendenziell ein Nachteil für die zuerst genannte Gruppe ($p = 0,143$). Denn 7 von 10 männlichen Patienten (70 %), welche einen weiblichen Spender hatten, entwickelten eine akute GvHD, während nur 27 der 60 weiteren Patienten erkrankten (45 %).

5.3.2 Chronische GvHD

Die chronische Form der GvHD tritt definitionsgemäß ab dem Tag 100 nach einer HSZT auf. Sie kommt dem klinischen Bild einer Autoimmunerkrankung nahe. Je nach Organbeteiligung wird eine extensive von einer limitierten Form unterschieden. Ein Einschlusskriterium für die Analyse der chronischen GvHD war das Überleben über den Tag 100 nach HSZT hinaus. 8

der 70 Patienten verstarben vor dem Tag 100 nach HSZT. Bei 22,6 % der über den Tag 100 hinaus überlebenden Patienten wurde eine chronische GvHD dokumentiert ($n = 14$). Darunter fanden sich 7 der 34 Jungen (20,6 %) und 7 der 28 (25,0 %) Mädchen ($p = 0,68$). Kinder, welche an einer chronischen GvHD erkrankten, hatten ein medianes Alter von 14 Jahren (10 Monate bis 22 Jahre), demgegenüber lag das mediane Alter bei Kindern ohne chronischer GvHD bei 12 Jahren (17 Monate bis 22 Jahre). 6 von 29 Kinder unter 12 Jahren (20,7 %) sowie 8 von 33 der 12 jährigen und älteren Kinder (24,2 %) erkrankten an der chronischen GvHD ($p = 0,74$). Die Inzidenz der chronischen GvHD unterschied sich in den jeweiligen Gruppen nicht signifikant.

Bei 13 der 14 Kinder manifestierte sich eine extensive (92,9 %), bei einem Patienten eine limitierte Form der chronischen GvHD. 11 Patienten mit akuter GvHD entwickelten im Verlauf eine chronische GvHD, während nur 3 Patienten mit chronischer GvHD zuvor nicht an einer akuten GvHD erkrankt waren. Der χ^2 Test zeigte, dass die Häufigkeit einer chronischen GvHD signifikant höher war, wenn Patienten zuvor an der akuten Form der GvHD erkrankten ($p = 0,022$).

9 von 30 mittels Chemotherapie konditionierter Patienten (30,0 %) entwickelten eine chronische GvHD. 5 von 32 Kinder (15,6 %), welche eine Kombination aus Chemotherapie und fraktionierter Ganzkörperbestrahlung erhielten, erkrankten an der chronischen GvHD. Die Inzidenz der Gruppen unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,18$).

In unserer Studie stellten die Eigenschaften des Transplantates ebenfalls keine statistisch signifikanten Risikofaktoren für die Entwicklung einer chronischen GvHD dar. Im χ^2 Test beziehungsweise im exakten Test nach Fisher konnten wir keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Inzidenz der chronischen GvHD zwischen der Verwendung von PBSZ und Knochenmark (χ^2 , $p = 0,28$), zwischen Familien- und Fremdspenden (χ^2 , $p = 0,26$), bei HLA-identischen und nicht-identischen Transplantationen (Fisher, $p = 0,41$) als auch bei Geschlechterübereinstimmung und Fällen, in denen die Geschlechter von Patient und Spender nicht übereinstimmten (χ^2 , $p = 0,20$) sowie zwischen männlichen Patienten, welche einen weiblichen Spender hatten, und allen weiteren Patienten (χ^2 , $p = 0,393$), nachweisen.

5.3.3 Rezidiv

Bei 13 der 70 Patienten (18,6 %) kam es zu einem Rezidiv der Grunderkrankung. Davon erkrankten zuvor 5 Kinder an einer akuten GvHD. Bei einem Patient mit Rezidiv wurde sowohl eine akute als auch eine chronische GvHD dokumentiert. Jedoch konnten wir weder zwischen akuter ($p = 0,85$) noch zwischen chronischer GvHD und dem Auftreten eines Rezidivs ($p = 0,44$) einen statistisch signifikanten Zusammenhang feststellen.

7 der 30 Mädchen und 6 der 40 Jungen erkrankten an einem Rezidiv ($p = 0,20$). 8 von 32 Kinder waren jünger als 12 Jahre und entwickelten ein Rezidiv, während es bei 5 von 38 der 12 jährigen und älteren Kinder zu einem Rezidiv der Grunderkrankung kam ($p = 0,75$). Sowohl das Geschlecht als auch das Alter der Patienten zeigten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zur Entwicklung eines Rezidivs.

Die Inzidenz für das Auftreten eines Rezidivs unterschied sich nicht signifikant zwischen den unterschiedlichen Konditionierungsregimen ($p = 0,85$), zwischen der Verwendung von PBSZ und Knochenmark ($p = 0,43$), zwischen Transplantationen, welche Material von verwandten und nicht verwandten Spendern nutzten ($p = 0,75$), zwischen HLA-identischen und nicht-identischen Transplantationen ($p = 0,42$) und zwischen einer Geschlechterübereinstimmung und Geschlechterdiskrepanz ($p = 0,70$).

5.3.4 Überleben

Bis zum festgelegten Beobachtungsendpunkt, d.h. 5 Jahre nach HSZT, waren noch 44 der 70 Patienten am Leben (62,9 %). 8 Kinder verstarben an ihrer Grunderkrankung, 8 Transplantierte verstarben an einem Multiorgan- und ein Patient an einem akuten Lungenversagen. 2 Kinder erlagen den Komplikationen der akuten GvHD und 5 verstarben an den Folgen einer Infektion. 1 Kind verstarb an einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura.

13 von 34 Patienten mit akuter GvHD (38,2 %) und 14 von 36 Patienten ohne akuter GvHD (38,9 %) verstarben bis zum Beobachtungsende ($p = 0,99$). 8 Kinder verstarben bereits vor Erreichen des Tages 100 nach HSZT. Von den bis zum Tag 100 Überlebenden verstarben 5 von 14 Patienten mit chronischer GvHD (35,7 %) und 14 von 48 Patienten, die nicht an einer

chronischen GvHD (29,2 %) erkrankten, innerhalb von 5 Jahren nach HSZT ($p = 0,64$). Die Inzidenz der Gruppen unterschied sich nicht signifikant.

Nur 2 von 13 Patienten mit Rezidiv (15,4 %) überlebten im Beobachtungszeitraum, während 41 von 57 Patienten (71,9 %), welche kein Rezidiv entwickelten, überlebten. Der χ^2 Test zeigte einen höchst signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,001$).

Die Letalität der 70 Patienten im beobachteten Zeitraum unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Grunderkrankungen ($p = 0,33$), zwischen Familien- und Fremdspenden ($p = 0,52$), zwischen HLA-identischen und nicht-identischen Transplantationen ($p = 0,32$) als auch zwischen Geschlechterübereinstimmung und -diskrepanz ($p = 0,93$).

18 von 36 mittels Chemotherapie konditionierte Kinder (50%) verstarben im Beobachtungszeitraum, während 9 von 34 Patienten, welche eine Konditionierung aus Chemotherapie kombiniert mit fraktionierter Ganzkörperbestrahlung erhielten (26,5 %), nicht überlebten. Der χ^2 Test zeigte hier einen signifikanten Unterschied ($p = 0,043$).

Die Letalität in den Patientengruppen, bei denen PBSZ verwendet wurden (16 von 30 Patienten, 53,3 %) unterschied sich signifikant von der Gruppe, in welcher Knochenmark transplantiert wurde (10 von 38 Patienten, 26,3 %). Im χ^2 Test erhielten wir eine Signifikanz von $p = 0,023$.

5.4 Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Therapieergebnis der allogenen HSZT

5.4.1 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD

In der Abbildung 5.6 ist der Einfluss von T_{reg} Zellen auf die akute GvHD zum Zeitpunkt vor HSZT dargestellt. Bei Patienten ohne akute GvHD (Grad 0) war die T_{reg} Zellzahl signifikant höher ($p = 0,037$) als bei Patienten mit akuter GvHD (Grad 1 bis 4).

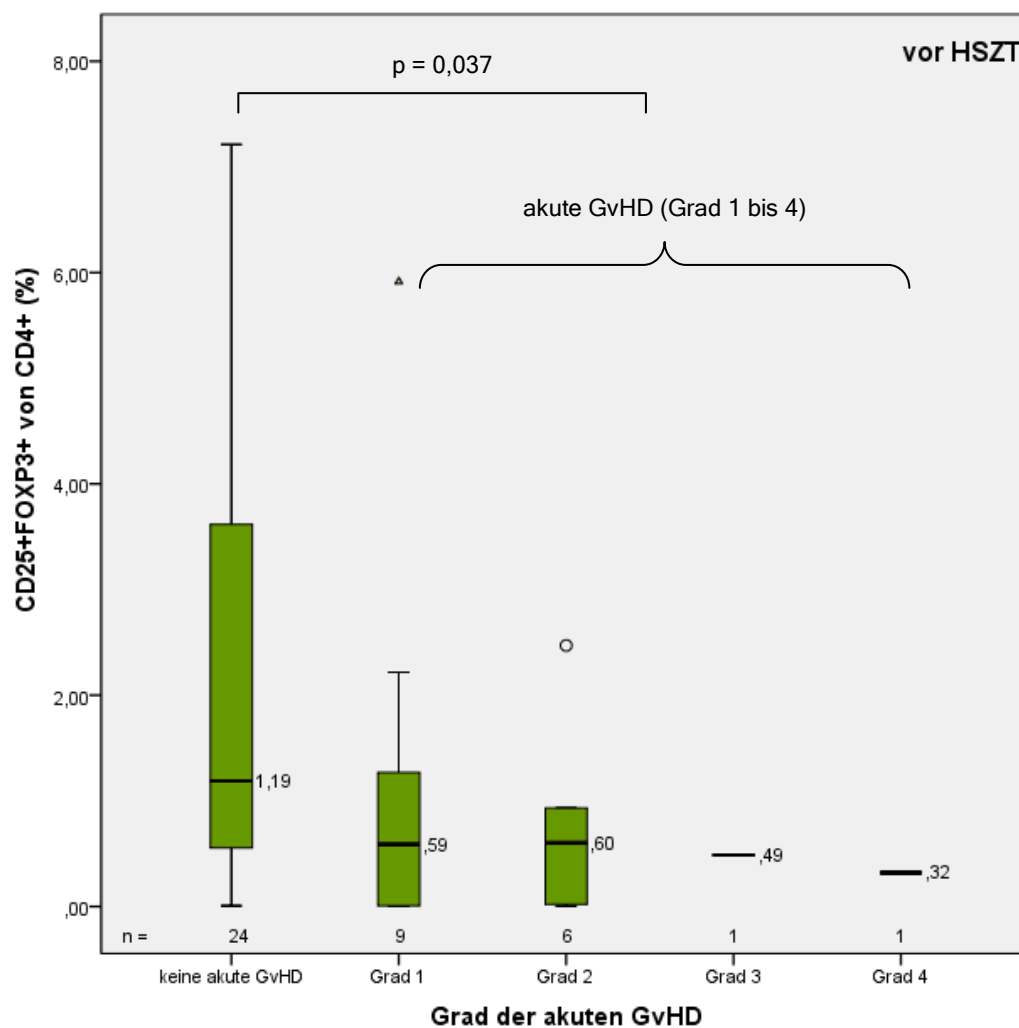


Abb. 5.6: Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD zum Zeitpunkt vor HSZT. Die CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellzahl war bei Patienten ohne akuter GvHD (Grad 0) signifikant höher als bei Patienten mit akuter GvHD (Grad 1 bis 4). Angegeben sind Median und Patientenzahl (n) für den jeweiligen Schweregrad der akuten GvHD sowie die Signifikanz (p). Ausreißer sind mit o gekennzeichnet, extreme Werte werden durch Δ dargestellt.

Die Abbildung 5.7 zeigt den Einfluss der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen auf die akute GvHD zu den Zeitpunkten nach HSZT (am Tag 30, 60 sowie 100). Es konnten zu keinem Zeitpunkt nach HSZT signifikante Unterschiede in der T_{reg} Zellzahl zwischen Patienten ohne akuter GvHD (Grad 0) und mit akuter GvHD (Grad 1 bis 4 bzw. Grad 1 bis 3) erhoben werden. Für die Zeitpunkte Tag 60 und Tag 100 lag kein Probenmaterial von Kindern, welche an einer akuten GvHD Grad 4 erkrankten, vor.

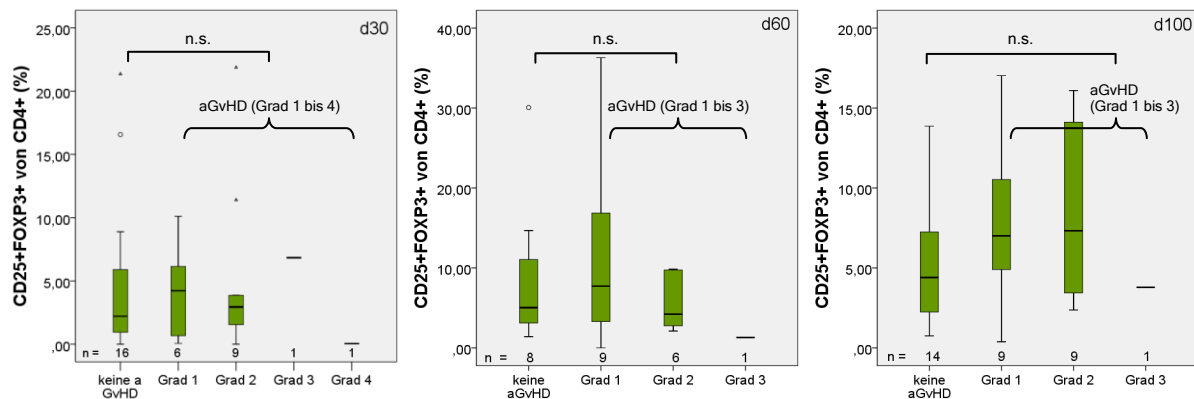


Abb. 5.7: Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD an den Tagen 30, 60 und 100 nach HSZT. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellzahl bei Patienten ohne akuter GvHD (Grad 0) und mit akuter GvHD (Grad 1 bis 4 bzw. Grad 1 bis 3). Angegeben sind der Tag nach HSZT (d) und die Patientenzahl (n) für den jeweiligen Schweregrad der akuten GvHD sowie die Signifikanz. Ausreißer sind mit o gekennzeichnet, extreme Werte werden durch Δ dargestellt. aGvHD - akute GvHD, n.s. - nicht signifikant.

5.4.2 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die chronische GvHD

In der Abbildung 5.8 wird der Einfluss der T_{reg} Zellen auf die chronische GvHD zu den Zeitpunkten vor sowie nach HSZT dargestellt. Es gab zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der T_{reg} Zellzahl zwischen Patienten ohne und mit chronischer GvHD.

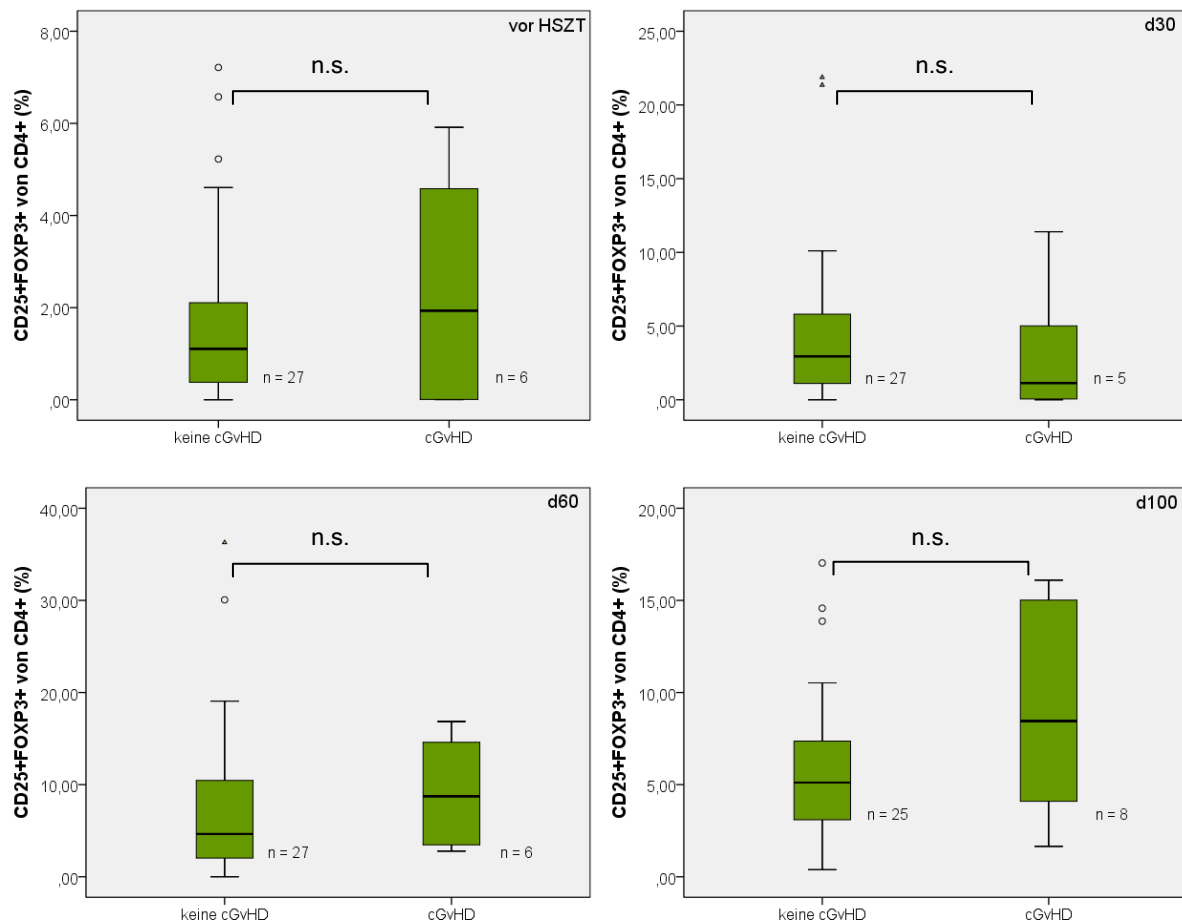


Abb. 5.8: Einfluss der T_{reg} Zellen auf die chronische GvHD zum Zeitpunkt vor HSZT und an den Tagen 30, 60 sowie 100 nach HSZT. Es gab zu allen untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in der $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellzahl bei Patienten mit und ohne chronischer GvHD. Angegeben sind Patientenzahl (n) und Signifikanz. Ausreißer sind mit o gekennzeichnet, extreme Werte werden durch Δ dargestellt. cGvHD - chronische GvHD, n.s. - nicht signifikant.

5.4.3 Einfluss der T_{reg} Zellen auf Rezidive

In der Abbildung 5.9 wird der Einfluss CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen auf das Auftreten von Rezidiven zu den Zeitpunkten vor sowie nach HSZT dargestellt. Wir konnten keine signifikanten Unterschiede der relativen T_{reg} Zellzahl zwischen Patienten mit und ohne Rezidiv nachweisen.

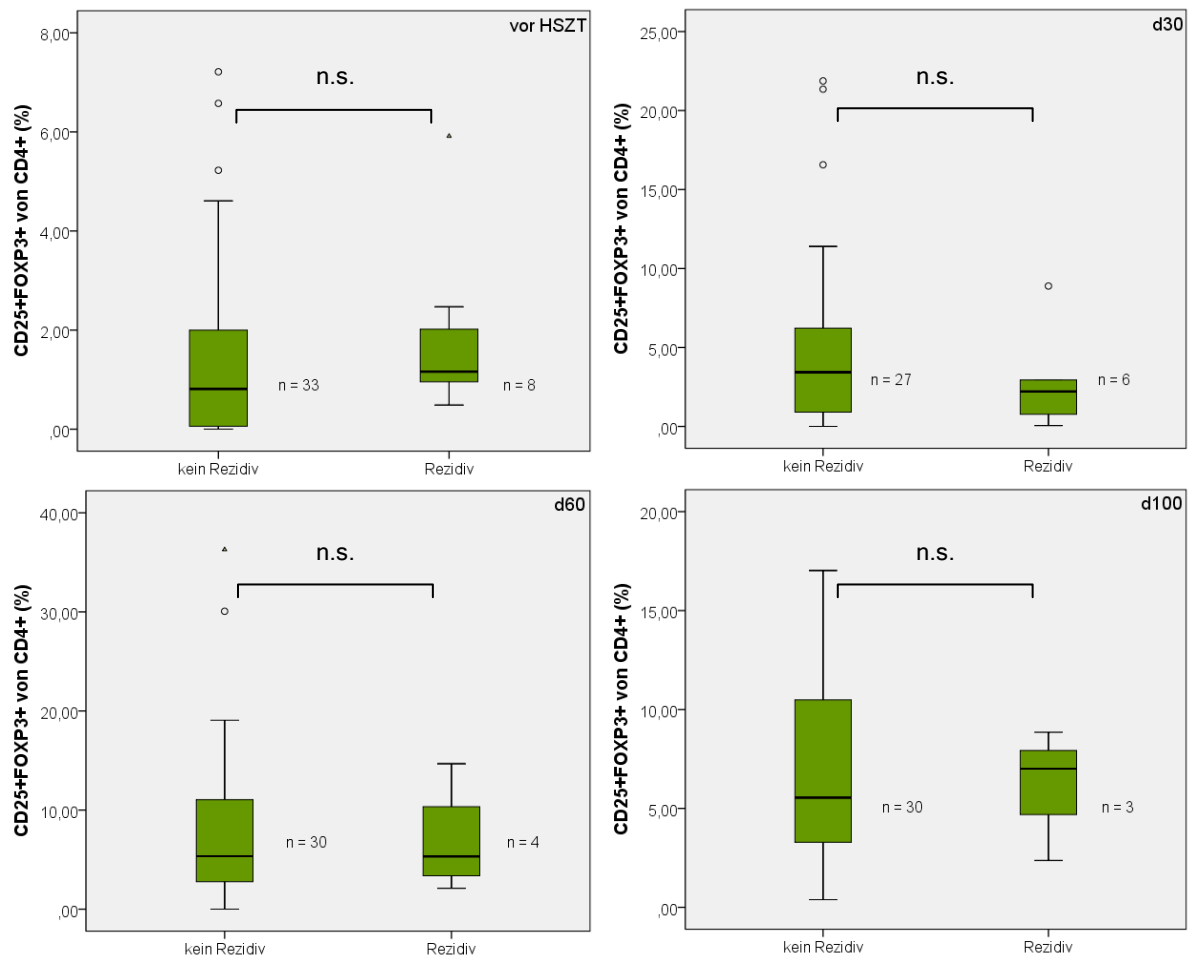


Abb. 5.9: Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Entstehen eines Rezidivs zum Zeitpunkt vor HSZT und an den Tagen 30, 60 sowie 100 nach HSZT. Es gab zu allen untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellzahl bei Patienten mit und ohne Rezidiv. Angegeben sind Patientenzahl (n) und Signifikanz. Ausreißer sind mit o gekennzeichnet, extreme Werte werden durch Δ dargestellt. n.s. - nicht signifikant.

5.4.4 Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Überleben

In den 5 Jahren der Beobachtung nach HSZT überlebten 44 von 70 Patienten. Die Abbildung 5.10 stellt die Korrelation der T_{reg} Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach HSZT mit dem Überleben der transplantierten Patienten bis zum Beobachtungsende dar. Es fand sich kein signifikantes Ergebnis.

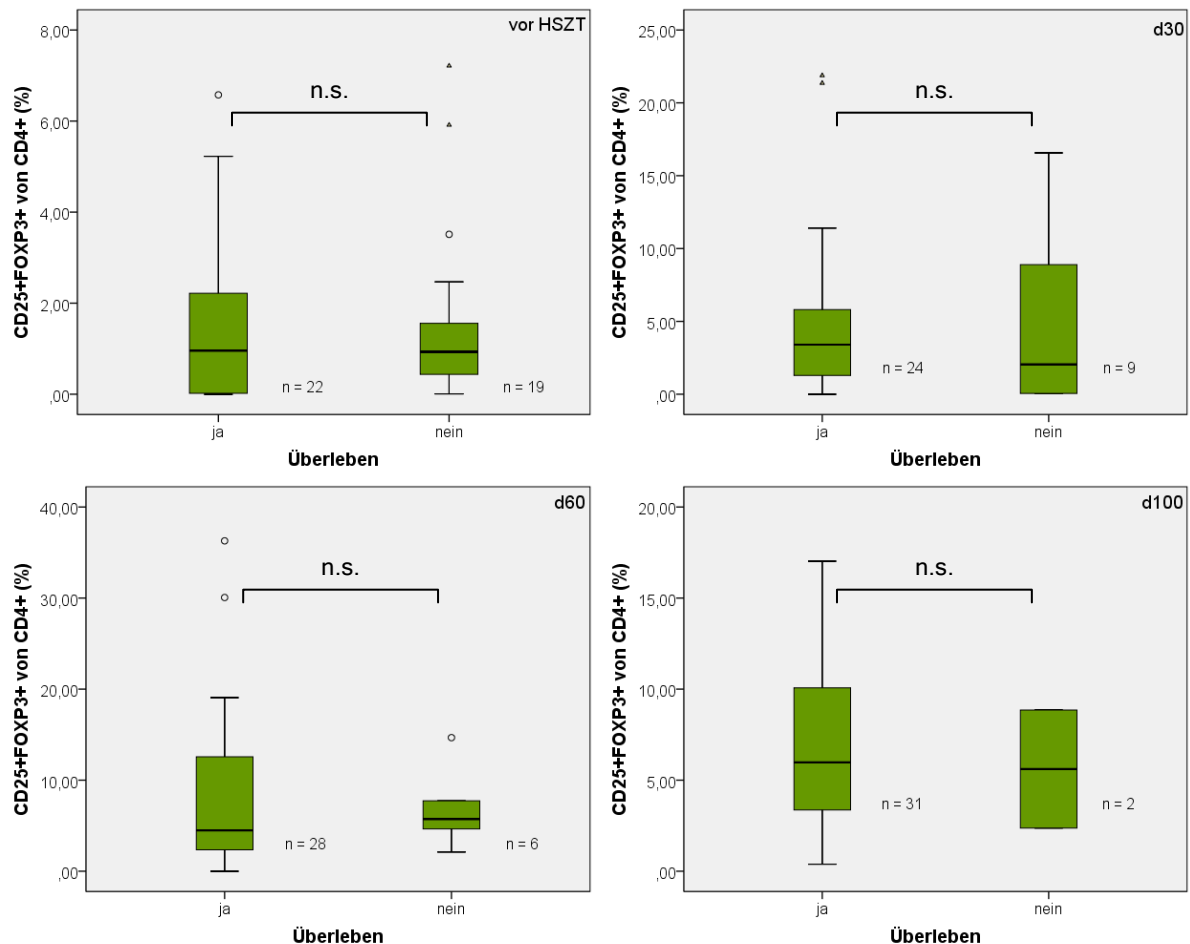


Abb. 5.10: Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Gesamtüberleben zum Zeitpunkt vor HSZT und an den Tagen 30, 60 sowie 100 nach HSZT. Es gab zu allen untersuchten Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede in der CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellzahl zwischen transplantierten Kindern, die im beobachteten Zeitraum überlebten, und verstorbenen Patienten. Angegeben sind Patientenzahl (n) und Signifikanz. Ausreißer sind mit o gekennzeichnet, extreme Werte werden durch Δ dargestellt. n.s. - nicht signifikant.

6 Diskussion

6.1 Nachweis von T_{reg} Zellen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die relative T_{reg} Zellzahl stammzell-transplantierte Kinder zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der HSZT sowie von einer gesunden Kontrollgruppe erhoben. Das Probenmaterial stammte aus kryokonservierten PBMNZ von 70 Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena, deren HSZT im Zeitraum von 05/1994 bis 04/2007 stattfand bzw. in der Kontrollgruppe von 17 Kindern ohne maligner, immunologischer oder infektiöser Grunderkrankung. Der Beobachtungszeitraum aller Patienten betrug 5 Jahre.

6.1.1 Korrelation von CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ und CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Zellen

T_{reg} Zellen besitzen aufgrund ihrer suppressiven Aktivität ein großes Potenzial in der Erforschung neuer Ansätze für Therapie und Prophylaxe der GvHD. Die Charakterisierung dieser Zellpopulation im humanen System ist jedoch erschwert. Um Funktion und klinischen Nutzen zu erforschen, benötigt man eine zuverlässige Nachweismethode für T_{reg} Zellen. Tests die Einzug in den klinischen Alltag finden sollen, müssen schnell durchzuführen, kostengünstig und reliabel sein. Des Weiteren möchte man für die Erforschung neuer Therapieansätze mit lebenden Zellen arbeiten. Zurzeit gibt es jedoch keinen klaren Konsens, der all diese Ziele berücksichtigt. Aktueller Goldstandard zur phänotypischen Markierung von T_{reg} Zellen ist FOXP3 (Hori et al. 2003, Fontenot et al. 2005). Der Transkriptionsfaktor FOXP3 kommt nur im Zellkern vor. Damit Antikörper an dieses intrazelluläre Molekül binden können, müssen die Zellen somit permeabilisiert werden. Eine quantitative Bestimmung ist möglich, jedoch können die Zellen im Anschluss nicht mehr für vitale Untersuchungen oder zu therapeutischen Zwecken verwendet werden. Hinzu kommt, dass der Nachweis von FOXP3 sowohl zeit- als auch kostenintensiv ist. Somit eignet er sich nicht für die routinemäßige Bestimmung der T_{reg} Zellzahl als Verlaufspareter und Prognosefaktor für Krankheitsverläufe oder Komplikationen.

Eine Möglichkeit den Nachweis am humanen System durchzuführen und im Anschluss vitale T_{reg} Zellen therapeutisch zu nutzen, besteht in der Bestimmung des Oberflächenmoleküls

CD127. Liu et al. zeigten, dass die erniedrigte Expression von CD127 mit der Zahl FOXP3⁺ Zellen und somit mit der suppressiven Funktion von CD4⁺ T_{reg} Zellen korreliert. T_{reg} Zellen exprimieren vermindert CD127 verglichen mit konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ peripheren T-Zellen (Liu et al. 2006).

Mit dieser Arbeit erbringen wir einen weiteren Beweis für die sehr gute Korrelation von CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ und CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Zellen. Beide Nachweismethoden wurden an 141 zur Verfügung stehenden Patientenproben durchgeführt. Wir analysierten PBMNZ zu allen Zeitpunkten vor und nach HSZT. Die methodische Aufarbeitung und Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe des Streudiagrammes, der residuenartigen Darstellung nach Bland und Altman als auch der Intraklassenkorrelation nach Lin. Im Streudiagramm visualisierten wir die sehr gute Korrelation durch die nah beieinander liegende Winkelhalbierende und Regressionsgerade. Eine vollkommene Konsistenz zweier Messmethoden wäre gegeben, wenn alle Messwertpaare genau auf der Winkelhalbierenden liegen würden. Da der Korrelationskoeffizient nach Pearson für eine Abweichung der Regressionsgeraden von der Winkelhalbierenden vollkommen unempfindlich und daher als Konsistenzmaß ungeeignet ist, ermittelten wir die Intraklassenkorrelation nach Lin als summarisches Konsistenzmaß. Mit einem IKK_{Lin} von 0,965 bestätigten wir die signifikant hohe Korrelation beider Nachweismethoden. Die Information über die Reliabilität der verschiedenen Messmethoden lässt sich nur unzureichend in einer einzigen Maßzahl fassen. Die residuenartige Darstellung nach Bland und Altman erfolgte in Ergänzung zur Präsentation im Streudiagramm mit Regressionsgerade und Winkelhalbierender und zur Angabe des IKK_{Lin} . Im Residuenplot befinden sich etwa 95 % der Werte im Bereich zwischen der 2fachen Standardabweichung des Mittelwertes der Differenz aus CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ und CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Zellen. Nur wenige Ausreißer liegen außerhalb dieser doppelten Standardabweichung. Die Werte streuen dabei sehr gleichmäßig um den Mittelwert der Differenz. Somit kann ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden (Guggenmoos-Holzmann und Wernecke 1996, Müller und Büttner 1994, Bland und Altman 1986).

Simonetta und Kollegen sehen die erniedrigte CD127 Expression nicht als charakteristisches Merkmal von T_{reg} Zellen. Je nach Lokalisation und Aktivierung der T_{reg} Zellen zeigten sie ein unterschiedliches Expressionslevel von CD127. Gleichzeitig war die CD127 Expression auf T_{reg} Zellen mit einer Expression von CD103 und ICOS (inducible costimulatory molecule)

assoziiert (Simonetta et al. 2010). Diese Oberflächenmoleküle wurden bereits als Marker für aktivierte T_{reg} Zellen identifiziert (Banz et al. 2003, Scott-Browne et al. 2007). Zwar kann durch die Bestimmung von $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen eine hoch angereicherte T_{reg} Zellpopulation isoliert werden, jedoch sieht Simonetta die Möglichkeit, dass damit aktivierte T_{reg} Zellen ausgeschlossen werden. Und gerade diese könnten im pathologischen Kontext von Immunantworten, also unter anderem bei der Therapie der GvHD, eine relevante Rolle spielen (Simonetta et al. 2010).

Zahlreiche weitere Forschungsarbeiten bestätigen unsere Ergebnisse der Korrelation $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen. Bereits 2003 zogen Cozzo et al. einen Zusammenhang zwischen T_{reg} Zellen und einer erniedrigten CD127 Expression (Cozzo et al. 2003). Auch Seddiki und Mitarbeiter diskriminieren zwischen humanen T_{reg} Zellen und aktivierten T-Zellen mit Hilfe der Bestimmung von CD127 und CD25 (Seddiki et al. 2006b). Das auch $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen Therapie relevant sein könnten, wurde durch Brunstein et al. bestätigt. Die Gruppen um Brunstein sowie Di Ianni infundierten erstmals isolierte T_{reg} Zellen parallel zur HSZT bzw. vor HSZT als GvHD Prophylaxe. Sie isolierten die T_{reg} Subpopulation mittels CD4 und CD25 (Positivselektion) bzw. CD8, CD19 (Negativselektion) und CD25 markierter magnetischer Mikrobeads. Anschließend Tests zeigten im isolierten Material einen medianen Prozentsatz $CD4^+FOXP3^+CD127^-$ Zellen von 64 % bzw. einen medianen Prozentsatz $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen von 69,2 %. Die Patienten um Di Ianni, welche einer Gruppe von Hochrisikopatienten in Bezug auf die Entwicklung einer GvHD angehörten, entwickelten nur in 2 von 28 Fällen eine akute GvHD, eine chronische GvHD trat bei keinem Patienten auf (Brunstein et al. 2011, Di Ianni et al. 2011).

Im Weiteren stellt sich daher die Frage, ob eine Isolierung einer nahezu reinen T_{reg} Zellpopulation zu therapeutischen Zwecken notwendig ist. Oder ist die Gabe von isolierten und *in vitro* expandierten $CD4^+CD25^+$ Zellen, welche bereits einen hohen T_{reg} Anteil beinhalten, für optimale Therapieergebnisse ausreichend? Aus diesem Grund und zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge sind weitere Forschungen zur Bestimmung der T_{reg} Zellen essentiell.

6.1.2 Methodische Diskussion

Neben den unterschiedlichen Nachweismethoden von T_{reg} Zellen gibt es Unterschiede in der Ermittlung der prozentualen T_{reg} Zellwerte. Wir bestimmten für den Nachweis von T_{reg} Zellen die CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen von allen CD4⁺ Zellen. Um Werte mit anderen Forschungsergebnissen vergleichen zu können, sollte eine einheitliche Bezugsgröße verwendet werden. Verschiedene Ansätze, sowohl die abweichende Phänotypisierung der T_{reg} Zellen (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, CD4⁺FOXP3⁺, CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺) als auch die Berechnung der Prozentsätze in Bezug auf differente Zellpopulationen (CD4⁺ Lymphozyten (T-Helferzellen) oder gesamte Lymphozytenpopulation) oder gar die Verwendung absoluter Zellzahlen, können widersprüchliche Ergebnisse erzeugen, welche entsprechend kritisch zu betrachten sind. In der Studie von Perz und Kollegen wurden die T_{reg} Zellen zum einen in Bezug auf die gesamte Lymphozytenpopulation und zum anderen auf die T-Helferzellen untersucht sowie die absolute T_{reg} Zellzahl ausgewertet. Der prozentuale T_{reg} Zellanteil unterscheidet sich zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe nur, wenn er auf die Gesamtzahl aller Lymphozyten bezogen ist, während der Anteil an den T-Helferzellen interessanterweise gleich bleibt. Die Forscher gehen davon aus, dass nicht die absolute T_{reg} Zellzahl, sondern der Anteil der T_{reg} Zellen an allen Lymphozyten das Verhältnis von T_{reg} Zellen auf die gesamte Zahl zu regulierender Zellen widerspiegelt und somit eine genauere Reflektion der Funktion von T_{reg} Zellen *in vivo* darstellt (Perz et al. 2012). Auch Magenau und Zorn nutzen die gesamte Lymphozytenpopulation als Bezugsgröße zur Berechnung der Prozentsätze (Zorn et al. 2005, Magenau et al. 2010). Mehr als die Hälfte der Studien zu T_{reg} Zellen beziehen sich hingegen auf CD4⁺ Lymphozyten und erzielen damit ebenso signifikante Ergebnisse. Darunter sind die Arbeiten von Clark und Rosenzwajg, beide ziehen jedoch keinen Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Clark et al. 2004, Rosenzwajg et al. 2011). Weitere Studien, beispielhaft von Nadal und Rezvani, können ebenso wie wir signifikant erhöhte T_{reg} Zellzahlen bei Patienten nach HSZT im Vergleich zu einer Kontrollgruppe darstellen, indem sie die relative T_{reg} Zellzahl auf die CD4⁺ Lymphozyten beziehen (Rezvani et al. 2006, Nadal et al. 2007). Wird im Folgenden in Bezug auf unsere Analysen von der T_{reg} Zellzahl gesprochen, gehen wir immer von dem prozentualen Anteil CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Zellen aller CD4⁺ Lymphozyten aus.

Während die differenten Verfahren zur T_{reg} Zellbestimmung zu diskutieren sind, sollten Standards in den Verfahren eingehalten werden, um Bestimmungsfehler zu vermeiden. Durch die Einhaltung von Hygienerichtlinien, die präzise Durchführung von Isolation und Konzentrationsbestimmung der Zellen mittels Durchflusszytometrie sowie einem standardisierten Vorgehen bei Einfrier- und Auftauprozessen konnten einzelne und systematische Fehler bei der quantitativen Bestimmung der T_{reg} Zellen nicht ausgeschlossen, aber dennoch minimiert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es durch den Einfrier- und Auftauprozess zu einer Schädigung der Zellen und folglich zu falsch niedrigen Ergebnissen kam. Es gab zum Teil lange Lagerungszeiten des Materials, so stammten die ältesten Proben von einem Patienten, welcher 1994 transplantiert wurde. Auch hier besteht die Möglichkeit einer Schädigung der Zellen.

Durch fehlendes Material konnten weitere Abweichungen hervorgerufen werden. Nicht von allen Patienten waren in flüssigem Stickstoff konservierte PBMNZ zu jedem untersuchten Zeitpunkt vorhanden. Teilweise wurden die Proben bereits für andere Untersuchungen genutzt und standen zu unseren Zwecken nicht mehr zur Verfügung oder es erfolgte die Blutentnahme nicht an den zu überprüfenden Zeitpunkten. Somit konnten keine Zeitverläufe für alle Patienten abgebildet werden. Nur bei 12 Patienten konnten Proben von allen vier Zeitpunkten analysiert werden. Ebenso erfolgten die Blutentnahmen selten exakt am Tag 30, 60 und 100 nach der Transplantation. Material für die Untersuchung von Tag 30 wurde frühestens am Tag 21, spätestens am Tag 38 nach Transplantation entnommen, sie erfolgte im Median 28 Tage nach HSZT. In die Gruppe Tag 60 wurden Blutentnahmen zwischen Tag 56 und Tag 64 nach HSZT eingeschlossen, im Median 60,5 Tage nach HSZT. In die Materialauswahl für den Tag 100 wurden Proben von Tag 97 bis Tag 148 aufgenommen, die mediane Blutentnahme erfolgte 102 Tage nach HSZT. In wenigen Fällen lag die Blutentnahme zum Zeitpunkt vor HSZT mehrere Wochen vor der Transplantation, während ebenso Material nur wenige Tage vor der HSZT zur Phänotypbestimmung der T_{reg} Zellen verwendet wurde. Die Spannweite beträgt dabei 31 Tage, im Median erfolgte die Blutentnahme 28 Tage vor der HSZT, minimal 8 und maximal 39 Tage vor HSZT. Alle Patienten befanden sich damit in einem gleichen Therapiestadium. Mit der Konditionierung wurde frühestens am Tag 7 vor HSZT begonnen. Es war somit kein Patient zum Zeitpunkt der Blutentnahme vor HSZT konditioniert und es hatte ebenso noch kein Patient eine GvHD-Prophylaxe erhalten. Einzig der zeitliche Abstand zur letzten Chemotherapie variiert und könnte Einfluss auf die T_{reg} Zellzahl genommen haben.

Um exakte vergleichbare Daten zu erhalten, sollten feste Standards in der klinischen Betreuung der Patienten etabliert werden und exakte Termine zur Blutabnahme vergeben werden. Vor allem zum Zeitpunkt vor HSZT sind die Probengewinnung und damit die T_{reg} Zellzahlbestimmung an einem bestimmten festgelegten Termin möglich.

6.1.3 Rekonstitution der T_{reg} Zellen nach HSZT im Vergleich zu einer Kontrollgruppe

Die Rekonstitution des Immunsystems ist ein entscheidender Faktor für die Prognose nach allogener HSZT. Bei verzögerter Rekonstitution kommt es zu einem erhöhten Risiko von Infektionen, Rezidiven und sekundären malignen Erkrankungen (Kim et al. 2013). Es folgt ein Vergleich unserer erhobenen Daten mit anderen Studien zur Rekonstitution der T_{reg} Zellen sowie einer Gegenüberstellung der T_{reg} Zellzahl pädiatrischer stammzelltransplantierter Patienten und gesunder Kinder.

Unsere Analysen der medianen T_{reg} Zellzahl aller Patienten zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg im Zeitverlauf. Der mediane prozentuale T_{reg} Zellwert lag vor HSZT bei 0,93 % und stieg am Tag 30 auf 2,94 % sowie im weiteren Verlauf auf 5,35 % (Tag 60) bzw. 5,97 % (Tag 100). Die T_{reg} Zellzahl vor Transplantation war signifikant niedriger als zu jedem untersuchten Zeitpunkt nach Transplantation. Auch am Tag 30 fanden sich signifikant weniger T_{reg} Zellen im peripheren Blut transplantierter Patienten als am Tag 60 sowie 100. Zwischen der T_{reg} Zellzahl am Tag 60 und 100 konnte kein statistisch signifikanter Unterschied erhoben werden. Zwar stieg die T_{reg} Zellzahl weiterhin an, jedoch nicht in einem signifikanten Ausmaß, ein Plateau wurde erreicht.

Auch Rezvani und Kollegen analysierten die T_{reg} Zellzahl im Zeitverlauf. Auch sie zeigten einen Anstieg der T_{reg} Zellen am Tag 30. Im Gegensatz zu unseren Daten sinkt die Zellzahl wieder im weiteren Verlauf nach HSZT (Rezvani et al. 2006). Olkinuora et al. konkretisierten die Rekonstitution des Immunsystems im Kindesalter, indem sie unter anderem einen Anstieg der T_{reg} Zellen nach mehr als 100 Tagen nach HSZT verzeichneten (Olkinuora et al. 2007). Perz et al. beobachteten die T_{reg} Zellzahl langfristig im Verlauf über 2 Jahre. Analysen erfolgten im Median 244, 510 bzw. 720 Tage nach HSZT. Sie konnten in dem genannten Zeitraum keinen Anstieg der T_{reg} Zellzahl beobachten. Eine Aussage über die Subpopulation

kurz nach HSZT wurde nicht getroffen (Perz et al. 2012). Wiederum andere Studien analysierten nur bereits selektionierte Patientengruppen im Zeitverlauf. Eine Aussage zu der Gesamtheit der Patienten wurde nicht getroffen (Seidel et al. 2006, Magenau et al. 2010).

Im Folgenden wird der Vergleich der erhobenen Patientendaten mit einer Kontrollgruppe diskutiert. Die Population der $CD4^+CD25^{high} T_{reg}$ Zellen macht zirka 1 bis 2 % der gesamten $CD4^+$ Zellzahl bei gesunden Menschen aus (Baecher-Allan et al. 2001). Angaben dazu finden sich in der Literatur jedoch nur für gesunde Erwachsene. Unsere Werte $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T_{reg} Zellen von gesunden Kindern lagen zwischen 0,30 % und 3,25 %, die mediane T_{reg} Zellzahl betrug 1,06 %. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zur relativen T_{reg} Zellzahl gesunder Kinder korrelieren folglich mit den Werten gesunder Erwachsener bisheriger Forschungsergebnisse (Baecher-Allan et al. 2001, Seddiki et al. 2006a). Wobei bei älteren Menschen (70 bis 90 Jahre) höhere T_{reg} Zellzahlen als bei jungen Menschen (20 bis 30 Jahre) beschrieben wurden (Gregg et al. 2005). Die wenigen vorliegenden pädiatrischen Studien zogen leider keinen Vergleich zwischen einer Kontrollgruppe und der Patientengruppe in Bezug auf die T_{reg} Zellzahl oder in der Kontrollgruppe waren keine bzw. keine gesunden Kinder eingeschlossen. Beispielsweise setzte sich die Kontrollgruppe in der bereits oben genannten finnischen Studie um Olkinuora und Kollegen aus autolog transplantierten und aufgrund nephrologischer Erkrankungen immunsupprimierten Kindern zusammen. Olkinuora et al. ermittelten eine signifikant niedrigere T_{reg} Zellzahl bei dieser Kontrollgruppe als bei allogenen transplantierten Patienten zum Zeitpunkt vor HSZT und mindestens 100 Tage nach HSZT (Olkinuora et al. 2007). Die österreichischen Kollegen um Seidel et al. veröffentlichten im Jahr 2006 eine weitere Studie zur Relevanz von T_{reg} Zellen bei der HSZT im Kindesalter. Sie verglichen die T_{reg} Zellzahl einer Kontrollgruppe mit der Zellzahl von allogenen transplantierten Kindern zum Zeitpunkt des T-Zell-Engraftments. Es ergab sich auch hier eine signifikante Erhöhung der T_{reg} Zellzahl bei der Patientengruppe. Leider wurden keine Angaben zum Alter der gesunden Kontrollgruppe gemacht (Seidel et al. 2006).

Wir nutzten weder PBMNZ von Spendern noch von anderen beispielsweise autolog transplantierten Patienten, um unsere Kontrolldaten zu erheben. Es wurde eine gesunde pädiatrische Gruppe ausgewählt. Die Kinder wurden im Rahmen eines elektiven Eingriffes (Schieloperation) in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena aufgenommen. Alle waren frei von Fieber und Infekten und litten weder an einer

malignen Grunderkrankung, noch wurden sie immunsuppressiv behandelt. Das mediane Alter lag bei 8 Jahren und somit etwas unter dem der Patientengruppe mit 12 Jahren. Trotzdem kann von einer immunologisch gleichwertigen Entwicklung ausgegangen werden. Im Rahmen der präoperativen Blutentnahme wurde, nach Einholung des Einverständnisses der Sorgeberechtigten, das Material für unsere Studienzwecke gewonnen. Die Proben wurden gleichermaßen, wie die der Patienten, aufbereitet, kryokonserviert und aufgetaut um vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen. Wir konnten damit erstmals Daten für gesunde Kinder veröffentlichen.

Im Vergleich unserer Patientenwerte mit denen der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich zum Zeitpunkt vor HSZT kein signifikanter Unterschied. Die mediane T_{reg} Zellzahl der Kontrollgruppe betrug 1,06 % im Vergleich zur Patientengruppe vor HSZT mit 0,93 %. Die Gruppe um Rezvani untersuchte PBMNZ von gesunden Spendern, bevor diese mit G-CSF zur Stammzellmobilisation behandelt wurden. Sie verglichen diese Daten mit denen an Leukämie erkrankter Patienten vor und zu festgelegten Zeitpunkten nach HSZT. Sie zeigten, dass die absolute Zahl $CD4^+$ Zellen bei der Patientengruppe vor HSZT signifikant erniedrigt war im Vergleich zur gesunden Spendergruppe. Der Anteil von T_{reg} an $CD4^+$ Zellen bei Leukämiepatienten war vor Transplantation relativ expandiert, was sich durch den erhöhten Prozentsatz $CD4^+FOXP3^+$ T-Zellen von Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe demonstrieren ließ. Die von uns untersuchten Kinder hatten im weiteren Verlauf kurz nach Transplantation (Tag 30) signifikant erhöhte relative $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ T_{reg} Werte im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Dies bestätigt die Forschungsergebnisse von Rezvani, welcher sowohl eine absolute als auch relative T_{reg} Expansion bei Patienten kurz nach der Transplantation nachwies (Rezvani et al. 2006). Zu späteren Zeitpunkten nach Transplantation (Tag 60 und 100) zeigten wir sogar eine höchst signifikante relative Erhöhung der T_{reg} Subpopulation bei Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Perz et al. untersuchten die Rekonstitution der $CD4^+$ Lymphozyten und der $CD4^+CD25^{high}127^{low}$ T_{reg} Zellen und fanden eine insuffiziente Erholung beider Populationen auch 2 Jahre nach HSZT im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (Perz et al. 2012).

Die unterschiedlichen Daten zur Rekonstitution der T_{reg} Zellen nach HSZT sind wohl auf abweichend selektionierte Patientengruppen zurückzuführen. Zum einen erfolgt die Rekonstitution von T-Zellen bei Kindern, vermutlich aufgrund der altersabhängigen

Thymusinvolution, schneller (Kalwak et al. 2002, Kim et al. 2013), bei älteren Menschen finden sich aber aus unklaren Gründen erhöhte T_{reg} Zellzahlen im peripheren Blut (Gregg et al. 2005). Weitere zahlreiche Einflussfaktoren werden in der Literatur diskutiert. Die Rekonstitution des Immunsystems zeigt sich z.B. auch von der Stammzellquelle abhängig. Knochenmarktransplantierte Patienten zeigten im Vergleich zu Patienten, welche PBSZ erhielten, eine verzögerte Rekonstitution. In der Literatur werden dafür 2 Gründe angegeben: Ein PBSZ-Transplantat beinhaltet eine 17fach erhöhte Zahl an T-Helferzellen im Vergleich zu einem Knochenmarktransplantat. Die PBSZ leben des Weiteren längere Zeit im Empfänger und tragen somit direkt zur Immunrekonstitution bei (Ottinger et al. 1996). Für weitere Forschungen scheint es entscheidend, Studien mit größeren Patientenzahlen und homogen vergleichbaren Gruppen durchzuführen.

6.2 Therapieergebnis unabhängig von T_{reg} Zellen

Neben der quantitativen Bestimmung der T_{reg} Zellzahl erfolgte das Aktenstudium und die statistische Auswertung der Patientendaten. Im Folgenden werden mögliche Einflussfaktoren auf die Inzidenzen der akuten und der chronischen GvHD, des Rezidivs und die Anzahl, der im Beobachtungszeitraum verstorben Patienten diskutiert. Darunter finden sich Alter und Geschlecht der Patienten, Grunderkrankung, Konditionierungsregime, verwendete Stammzellquelle, HLA-Kompatibilität, Familien- oder Fremdspende und Geschlechterdiskrepanz.

6.2.1 Risikofaktoren der GvHD nach allogener HSZT im Kindesalter.

Das Alter der Patienten wird in der Literatur mehrfach als Risikofaktor für die Entwicklung einer GvHD beschrieben. Die Inzidenz einer signifikanten akuten GvHD (Grad 2 bis 4) bei Patienten unter 20 Jahren, welche eine vollständige GvHD-Prophylaxe mit MTX erhielten, liegt bei annähernd 20 % (Chao und Sullivan 2009). Wobei vergleichend die Inzidenz bei 45 – 50 jährigen Patienten bzw. bei 51 – 62 jährigen Patienten, welche die gleiche GvHD-Prophylaxe erhielten, 30 % bzw. 79 % beträgt (Kollman et al. 2001). Die Inzidenz der akuten GvHD bei älteren Patienten ist dabei oft weiter erhöht, da sie aufgrund der Co-Morbidität häufiger keine volle GvHD-Prophylaxe erhalten können (Appelbaum 2009). Schwere und Inzidenz der chronischen GvHD sind bei Erwachsenen gegenüber Kindern ebenfalls erhöht (Karrer 2003). Innerhalb unserer pädiatrischen Patientengruppe zeigte sich kein Einfluss des

Alters auf die GvHD-Inzidenz. Kinder mit akuter als auch chronischer GvHD, waren nicht signifikant älter, als Kinder, welche keine GvHD entwickelten ($\text{Median}_{\text{aGvHD}}$ 12 bzw. 11,5 Jahre, $p_{\text{aGvHD}} = 0,46$; $\text{Median}_{\text{cGvHD}}$ 14 bzw. 12 Jahre, $p_{\text{cGvHD}} = 0,74$). Vergleichend mit oben genannten Studien bei älteren Patienten lagen die Inzidenzen in unserer Patientengruppe bei der akuten GvHD des Grades 2 bis 4 bei 25 % und bei der chronischen GvHD bei 20 %. Dies bestätigt wiederum die Altersabhängigkeit. Zwar konnten wir damit keinen Nachweis der Altersabhängigkeit innerhalb unserer Patientengruppe erbringen, bestätigen aber andere Literaturergebnisse, welche deutliche Differenzen bei der Inzidenz der GvHD zwischen Kindern und Erwachsenen sahen. Kollman et al. publizierten, dass nicht nur das Alter des Patienten, sondern auch des Spenders eine Bedeutung für die GvHD hat. Sie dokumentieren eine kumulative Inzidenz der akuten GvHD Grad 3 und 4 von 30 %, 34 % und 34 % in den Gruppen mit einem Spenderalter von 18 bis 30 Jahren, 31 bis 45 Jahren und mehr als 45 Jahren. Die Inzidenzen der chronischen GvHD in den zuvor genannten Gruppen lag bei 44 %, 48 % und 49 % (Kollman et al. 2001). Auch die Essener Kollegen um Ottinger sahen sowohl im Alter des Patienten, als auch des Spenders einen entscheidenden Risikofaktor für die Entwicklung einer akuten GvHD (Ottinger et al. 2003).

Aufgrund der Verwendung von unterschiedlichen Konditionierungsregimen und GvHD-Prophylaxe-Strategien, z.B. DLT, kann die GvHD-Inzidenz innerhalb der verschiedenen Grunderkrankungen deutlich variieren. Wir analysierten die zwei größten Patientengruppen, Kinder mit AML und ALL. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied in der Entwicklung einer GvHD aufgrund der Grunderkrankung zwischen den beiden Gruppen dokumentieren. Untersuchungen für die anderen Grunderkrankungen waren aufgrund der geringen Fallzahlen nicht möglich. Studien zur Untersuchung von Risikofaktoren der GvHD fallen zum Faktor Stammzellquelle different aus. So postulierte die Gruppe um Hahn, dass die Diagnose einer CML das Risiko einer akuten GvHD insgesamt erhöht, während Jagasia und Kollegen dies nur für die Gruppe von UCB-transplantierten CML-Patienten bestätigten (Hahn et al. 2008, Jagasia et al. 2012).

Wie bereits unter 2.2.2 ausgeführt wurde, werden APC durch die zugrundeliegende Erkrankung und das Konditionierungsregime aktiviert. Das Gewebe des Patienten wird besonders durch eine Ganzkörperbestrahlung geschädigt, Entzündungsmediatoren werden daraufhin vermehrt sezerniert. Dies beinhaltet die erste Phase des 3-Stufen-Modells der

Pathophysiologie der akuten GvHD (Ferrara et al. 2009). Dennoch zeigte sich ein Vorteil der Konditionierung mit Bestrahlung im Vergleich zu reinen chemotherapeutischen Regimen. In unserer Studie entwickelten mehr Patienten eine GvHD, die mittels Chemotherapie konditioniert wurden, als Patienten, welche eine Kombination aus Chemotherapie und fraktionierter Ganzkörperbestrahlung erhielten. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p_{aGvHD} = 0,23$, $p_{cGvHD} = 0,18$). Socié et al. verglichen die Langzeitergebnisse aus 4 randomisierten Studien zwischen den Konditionierungsregimen Busulfan mit Cyclophosphamid (BU CY) und Ganzkörperbestrahlung mit Cyclophosphamid (TBI CY). Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Konditionierungsregime nicht das ereignisfreie Überleben (engl. event-free survival, EFS) beeinflussten (Socié et al. 2001). Lediglich eine der 4 Studien, die der schwedischen Kollegen um Ringdén, dokumentierte eine signifikant niedrigere Inzidenz ($p = 0,05$) der chronischen GvHD bei der Verwendung von TBI CY im Vergleich zum BU CY-Regime bei Patienten mit AML, ALL und CML (Ringdén et al. 1999). Unterschiede zwischen beiden Gruppen in der Entwicklung einer akuten GvHD waren in keiner der Studien signifikant. Die Metaanalyse um Hartman et al., welche Daten aus 5 Studien beinhaltet, sah keinen Unterschied bei dem klinisch relevanten EFS zwischen beiden Konditionierungsregimen (Hartman et al. 1998). Auch Granados und Mitarbeiter fanden keinen signifikanten Unterschied bei der Entwicklung einer klinisch relevanten akuten GvHD bzw. einer chronischen GvHD. Die Unterteilung in Patientengruppen jünger und älter als 6 Jahre zeigte ebenfalls keine Abweichungen (Granados et al. 2000). Die US-Amerikaner um Bunin verglichen die Konditionierungsregime bei pädiatrischen Patienten mit ALL. Sie ermittelten ein EFS aller mit TBI CY behandelten Patienten von 58 % im Vergleich zum BU CY-Regime mit 29 % ($p = 0,03$). Signifikante Unterschiede konnten dabei nur bei nicht-verwandten Stammzellspenden erhoben werden. Die Spätfolgen einer Ganzkörperbestrahlung bezüglich der Entwicklung können gerade für pädiatrische Patienten weitreichend sein, die Kollegen zeigten aber einen eindeutigen Vorteil des TBI CY-Regimes (Bunin et al. 2003). Weitere Studien müssen folgen. Zukünftige Ergebnisse sollten dabei zwischen den verschiedenen Grunderkrankungen differenzieren.

Wie bereits unter 2.2.2 genannt, ist die Stammzellquelle als Risikofaktor der GvHD Gegenstand zahlreicher Studien. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der verwendeten Stammzellquelle und dem Auftreten einer akuten GvHD konnte trotz des höheren T-Zellgehaltes PBSZ-Transplante bisher nicht dargestellt werden, das Risiko ist allenfalls

marginal erhöht (Scheffold et al. 2004). Es wurde aber in mehreren Studien gezeigt, dass das Risiko nach der Transplantation von PBSZ an einer chronischen GvHD zu erkranken um 15 bis 20 % erhöht war (Bensinger 2012, Stamatović et al. 2011, Pidala et al. 2009, Hahn et al. 2008). Wir konnten bei der Transplantation von PBSZ verglichen mit der Verwendung von Knochenmark weder einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung einer akuten noch einer chronischen GvHD darstellen ($p_{\text{aGvHD}} = 0,14$, $p_{\text{cGvHD}} = 0,28$). Dabei kann die Inhomogenität der Gruppen, d.h. selektionierte und unselektionierte PBSZ-Spenden wurden aufgrund der Fallzahlen zusammengefasst, Einfluss auf das Ergebnis genommen haben. Die Verwendung von Nabelschnurblut hinsichtlich des GvHD-Risiko wird derzeit noch kontrovers diskutiert (Brunstein et al. 2007, Eapen et al. 2007). Viele Studien sehen jedoch Vorteile hinsichtlich des GvHD-Risikos. So wird eine niedrigere GvHD-Inzidenz mit dem niedrigeren Lymphozytengehalt sowie der funktionellen Unreife der fetalen Immunzellen begründet. Da nur ein Patient in unserer Studie Stammzellen aus Nabelschnurblut erhielt, ließen sich über Vor- oder Nachteile dieser Stammzellquelle keine signifikanten Aussagen treffen. Das zurzeit effektivste Verfahren zur Vermeidung einer GvHD ist die T-Zelldepletion. CD34^+ antikörpermarkierte Stammzellen werden dabei mittels immunomagnetischer Selektion aus dem Transplantat separiert. Das Oberflächenmolekül CD34 ist der charakteristische Marker der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Von dieser entwickeln sich alle weiteren differenzierten hämatopoetischen Zellen. Bei der allogenen HSZT ist durch diese Separation das Transplantat nahezu frei von reifen T-Lymphozyten und es verringert sich das GvHD Risiko signifikant (Booth et al. 2013). Die Zahl der mittels CD34^+ selektionierten PBSZ transplantierten Patienten war in unserer Studie zu gering, um statistisch veritabile Aussagen auf einen Einfluss auf die GvHD-Entwicklung treffen zu können.

Das Geschlecht des Patienten allein spielte in unserer Arbeit sowie in der Literatur keine wesentliche Rolle an der Entwicklung einer GvHD. Es erkrankten nicht mehr Jungen an einer GvHD als Mädchen ($p_{\text{aGvHD}} = 0,84$, $p_{\text{cGvHD}} = 0,68$). Eine Geschlechterdiskrepanz führt jedoch zur Erhöhung der GvHD-Rate. Das Risiko aufgrund einer möglichen Sensibilisierung gegen das männliche HY-Antigen für einen männlichen Patienten an einer GvHD zu erkranken ist mit bis zu 68 % deutlich erhöht, wenn der Spender weiblich ist und bereits mehrfach entbunden hat (Kollman et al. 2001, Rufer et al. 1998, Goulmy et al. 1996, Weisdorf et al. 1991, Gale et al. 1987). Wir konnten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der GvHD-Entwicklung und einem Geschlechter-Mismatch herstellen ($p = 0,35$). Patienten, deren

Geschlecht mit dem ihres Spenders übereinstimmte, erkrankten aber tendenziell seltener an einer akuten GvHD, als Patienten, bei denen eine Geschlechterdiskrepanz vorlag (43,9 % vs. 55,2 %). Bei der Differenzierung zwischen männlichen Empfängern, welche einen weiblichen Spender hatten, und allen anderen Patienten, zeigte sich, identisch zu anderen Studien, ein Nachteil für die zuerst genannte Gruppe (70 % vs. 45 %, $p = 0,143$). Jedoch war der Unterschied in unserer Studie nicht signifikant, was an der geringen Gruppengröße liegen kann.

Entscheidend für die Entwicklung einer akuten GvHD sind die Spendereigenschaften. Die Verwendung von Stammzellen von genotypisch HLA-identischen Geschwistern gilt in der Literatur weltweit als ideal. Da jedoch nur zirka 30 % der Patienten ein HLA-identisches Geschwister haben, und diese Zahl aufgrund der sinkenden Geburtenraten weiter fällt, müssen auch HLA-kompatible Fremd- sowie partiell HLA-identische Familienspendertransplantationen durchgeführt werden (Kröger und Zander 2008). Dabei korreliert das Ausmaß der Histokompatibilität direkt mit der Inzidenz, dem Zeitpunkt des Ausbruches und dem Schweregrad der GvHD (Karrer 2003, Klingebiel und Schlegel 1998, Szydlo et al. 1997). Ottinger und Mitarbeiter veröffentlichten 2003 Daten für das Therapieergebnis nach HLA-identischen Geschwister-, HLA-teilidentischen Familien- und HLA-kompatiblen Fremdspendertransplantationen. Die Inzidenz der akuten GvHD lag in den genannten Gruppen bei 40 %, 58 % und 45 %. Der Ausbruch der GvHD war bei HLA-identischen Geschwistertransplantationen deutlich später als bei den beiden anderen Gruppen (Ottinger et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit nahmen oben genannte Eigenschaften des Transplantats jedoch keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entwicklung einer GvHD. Die Inzidenz der akuten GvHD war bei nicht HLA-identischen Transplantationen erhöht, dieser Unterschied war hier jedoch nicht signifikant ($p = 0,088$). Unter der Verwendung von HLA-identischen Stammzellen entwickelten nicht signifikant weniger Patienten eine chronische GvHD als bei der Verwendung nicht HLA-identischer Transplantate ($p = 0,41$).

Die Erkrankung an einer akuten GvHD stellt den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer chronischen GvHD dar (Horwitz und Sullivan 2006). Dieser in der Literatur unumstrittene Sachverhalt lässt sich durch unsere Daten bestätigen. Bei 78,6 % der Patienten mit chronischer GvHD wurde zuvor eine akute GvHD dokumentiert. Damit war die Häufigkeit einer chronischen GvHD signifikant höher, wenn Patienten an der akuten Form der GvHD

erkrankten ($p = 0,022$). Die Reduktion der Inzidenz der chronischen GvHD liegt damit bereits in der Verhinderung der akuten GvHD.

6.2.2 Rezidiv und Überleben bei allogenen transplantierten pädiatrischen Patienten

Die HSZT ist der Therapieansatz mit dem größten kurativen Potential für hämato-onkologische Erkrankungen. Trotzdem ist das Auftreten eines Rezidivs der Grunderkrankung die Hauptursache für ein Therapieversagen (Kröger und Zander 2008, Sullivan et al. 1989). Deshalb gilt es neben den Risikofaktoren für die Entwicklung einer GvHD auch die Risikofaktoren für das Auftreten eines Rezidivs zu kennen und zu vermeiden. Insgesamt entwickelten 18,6 % unserer Patienten ein Rezidiv. Auch in unserer Studie hatte diese Patientengruppe die höchste Mortalitätsrate. Nur 15,4 % Patienten mit Rezidiv überlebten im Beobachtungszeitraum von 5 Jahren, während 71,9 % der Patienten ohne Rezidiv überlebten ($p < 0,001$).

Eine Arbeit des Huddinge Universitätsklinikums Stockholm, Schweden, analysierte das Rezidivrisiko bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen, welche eine Stammzellspende von einem Fremdspender erhielten. Die Kollegen ermittelten in der multivarianten Studie vier unabhängige Risikofaktoren für die Entwicklung eines Rezidivs. Patienten, welche sich in fortgeschrittenen Krankheitsstadien, d.h. jenseits der ersten kompletten Remission (engl. complete remission, CR) bzw. der ersten chronischen Phase (engl. chronic phase, CP) befanden, zeigten ein deutlich erhöhtes Rezidivrisiko gegenüber Patienten in CR1/CP1. Das Ausbleiben und ein milder Verlauf einer akuten GvHD (Grad 0 und 1) oder auch das Fehlen der Entwicklung einer chronischen GvHD erhöhten ebenfalls das Rezidivrisiko. Patienten mit der Grunderkrankung einer ALL entwickelten ebenfalls signifikant häufiger ein Rezidiv im Vergleich zu Patienten mit anderen malignen hämatopoetischen Grunderkrankungen. Die Inzidenz eines Rezidivs stieg bei den untersuchten Patienten mit der Zahl der oben genannten Risikofaktoren. Die kumulative Inzidenz lag bei 31 %, wenn 1 oder 2 Faktoren zutrafen, bei 3 Faktoren erhöhte sie sich auf 54 %, trafen alle vier Risikofaktoren zu, lag sie bei 81 % (Remberger et al. 2002). Insbesondere das Ausbleiben einer GvHD wurde bereits in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts als eindeutiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Rezidivs identifiziert (Weiden et al. 1981, Sullivan et al. 1989). Dies wurde durch erhöhte Rezidivraten bei CML-Patienten,

die als GvHD-Prophylaxe T-Zell depletierte Transplantate erhielten, belegt und auf diese Weise die wichtige Rolle der T-Lymphozyten des Spenders für den Therapieerfolg der HSZT postuliert. Das Vorhandensein des durch allogene T-Lymphozyten vermittelten GvL-Effektes wurde somit bewiesen (Kröger und Zander 2008, Horowitz et al. 1990, Marmont et al. 1991). Kolb und Kollegen nutzten diese Beobachtungen und dokumentierten erstmals die Therapie des Rezidivs durch eine DLT (Kolb et al. 1990). Unsere Arbeit bestätigt den Trend, dass insbesondere eine chronische GvHD auf die Entwicklung eines Rezidivs protektiv wirkt. Es konnten jedoch keine signifikanten Ergebnisse dargestellt werden ($p_{aGvHD} = 0,85$; $p_{cGvHD} = 0,44$).

Remberger und Kollegen dokumentierten eine Abnahme der 5-Jahres-Überlebensrate mit dem Schweregrad der akuten GvHD. In den Gruppen der Patienten mit einer akuten GvHD Grad 0, 1, 2 und Grad 3 bis 4 sank die Überlebensrate signifikant von 57 % auf 50 %, 49 % und 12 %. Patienten mit einer chronischen GvHD hingegen zeigten eine bessere Überlebensrate als Patienten, die keine chronische GvHD entwickelten (63 % vs. 45 %) (Remberger et al. 2002). Wir konnten die Ergebnisse der schwedischen Kollegen nicht bestätigen. Patienten mit akuter GvHD zeigten eine vergleichbare Mortalitätsrate wie Patienten ohne akuter GvHD ($p = 0,99$). Auch bei den bis zum Tag 100 überlebenden Patienten unterschied sich die 5-Jahres-Überlebensrate nicht signifikant zwischen Patienten mit und ohne chronischer GvHD ($p = 0,64$). Abweichungen könnten erneut durch das gewählte Studienmodell verursacht sein. Denkbar wäre auch der Einfluss des Alters, da unsere Daten von pädiatrischen Patienten stammen und beispielsweise Remberger et al. Patienten bis zum 60. Lebensjahr in ihre Studie einschlossen.

Der Einfluss der Stammzellquelle auf das Rezidivrisiko wurde wiederholt analysiert. Eine Vielzahl von Studien konnte keinen Vorteil von PBSZ gegenüber der Verwendung von Knochenmark bezüglich des Rezidivrisikos aufzeigen, mit Ausnahme von signifikant weniger Rezidiven bei PBSZ-transplantierten Patienten in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Powles et al. 2000, Blaise et al. 2000, Schmitz et al. 1998, Bensinger et al. 2012). Eine Metaanalyse dokumentierte zwar weniger Rezidive bei Transplantationen von PBSZ, dieser Unterschied stellte sich jedoch nicht signifikant dar (Cutler et al. 2001). Wir konnten in unserer Arbeit auch keinen signifikanten Unterschied in der Verwendung von PBSZ und Knochenmark bezüglich des Rezidivrisikos feststellen ($p = 0,43$). Allerdings war die 5-Jahres-Überlebensrate bei knochenmarktransplantierten Patienten signifikant höher, als bei der Verwendung von

PBSZ (73,7 % vs. 46, 7 %; $p = 0,023$). Unser Ergebnis wird durch die Studie um Schrezenmeier und Kollegen bestätigt. Auch sie zeigten innerhalb ihrer untersuchten Gruppe bei jüngeren Patienten (unter 20 Jahren) einen Vorteil der Transplantation von Knochenmark gegenüber PBSZ (Schrezenmeier et al. 2007). Gleichfalls unterstützen die Ergebnisse einer Studie der Universität von Kyoto, Japan, die Annahme, dass bei Kindern trotz schnellerem Engraftment bei der Verwendung von PBSZ im Vergleich zu Knochenmark die Überlebensrate schlechter ist (Shinzato et al. 2013). Ergebnisse aus Arbeiten mit erwachsenen Patienten zeigen sich konträr zu diesen Resultaten. Anasetti und Kollegen konnten in ihrer Veröffentlichung zum Vergleich von PBSZ und Knochenmark von unverwandten Spendern keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Überlebens notieren (Anasetti et al. 2012). Aufgrund des nachgewiesenen schnelleren Engraftments bei der Transplantation von PBSZ könnte man eine reduzierte TRM vermuten. Bensinger berichtete in seinem Überblick zum Vergleich der beiden Stammzellquellen, dass die allogene Transplantation von PBSZ nur bei HLA-identischen Geschwisterspenden einen Vorteil im Hinblick auf das Gesamtüberleben bietet (Pidala et al. 2009). Bei unverwandten Spenden stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar (Bensinger 2012, Chang et al. 2012). Der Effekt des schnelleren Engraftments bei PBSZ-Transplantationen scheint sich mit einer höheren Inzidenz der chronischen GvHD bezüglich des Gesamtüberlebens auszugleichen.

Die Konditionierung vor HSZT hat sich in den letzten Jahren von einer maximierten Radiochemotherapie zu einer individuellen Behandlung entwickelt. Basierend auf Grunderkrankung, Alter, Co-Morbidität, vorheriger Behandlung, Stammzellquelle und Spendereigenschaften können die Konditionierungsregime beachtlich variieren. Neben dem Einfluss der GvHD und der Art der Stammzellquelle auf die Entwicklung von Rezidiven oder das Gesamtüberleben wurde deshalb der Einfluss des Konditionierungsregimes geprüft. Dabei gibt es nur wenige prospektive randomisierte Studien. Langzeitergebnisse dieser Studien wurden in 2 retrospektiven Arbeiten des EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) und IBMTR analysiert (Ringdén et al. 1996, Socié et al. 2001). Aschan veröffentlichte 2007 eine Zusammenfassung der bisherigen Arbeiten. Er kam in seinem Review zu dem Ergebnis, dass Patienten mit AML und CML ein vergleichbares Outcome, d.h. ähnliche Rezidiv- und Gesamtüberlebensraten, bei der Verwendung von BU CY bzw. TBI CY hatten. ALL Patienten könnten jedoch von Regimen mit TBI profitieren, die Unterschiede zeigten sich jedoch nicht signifikant (Aschan 2007). Eine aktuellere Arbeit um

Gupta und Kollegen dokumentierte einen mäßigen Vorteil der TBI CY-Konditionierung im Hinblick auf das Gesamtüberleben und die Rezidivinzidenz, signifikante Aussagen konnten sie nicht treffen (Gupta et al. 2011). Hervorzuheben sind zwei Studien bei pädiatrischen Patienten. Zum einen eine kleinere randomisierte Studie an ALL Patienten und zum anderen eine retrospektive Arbeit des IBMTR. Das Gesamtüberleben und das Leukämie-freie Überleben zeigten sich bei Regimen mit TBI signifikant erhöht, die TRM war signifikant erniedrigt (Bunin et al. 2003, Davies et al. 2000). Auch in unserer Arbeit konnten wir diese Beobachtungen treffen. Es überlebten signifikant mehr TBI-Patienten im beobachteten Zeitraum im Vergleich zu nur mittels Chemotherapeutika konditionierten Kindern (73,5 % vs. 50 %, $p = 0,043$). Die Rezidivraten waren in beiden Gruppen vergleichbar ($p = 0,85$).

In unserer Arbeit nahmen des Weiteren das Alter und Geschlecht der Patienten, das Vorliegen einer Geschlechterdiskrepanz zwischen Spender und Empfänger, die Grunderkrankung sowie weitere Eigenschaften des Transplantates keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung eines Rezidivs oder auf das Gesamtüberleben nach HSZT. Eine mögliche Ursache für das Abweichen unserer Ergebnisse von bisherigen Veröffentlichungen könnte dabei auf die Inhomogenität der Gruppen zurückzuführen sein.

6.3 Therapieergebnis in Abhängigkeit von T_{reg} Zellen

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse der Bedeutung der T_{reg} Zellen im Rahmen der allogenen HSZT im Kindesalter. Die Auswertung des Therapieergebnisses erfolgte retrospektiv nach der Ermittlung der T_{reg} Zellzahl. D.h. die Patientenakten bzw. das Datenarchiv wurden nach der Messdatenerhebung auf eventuelle Zusammenhänge der T_{reg} Zellzahl zum klinischen Geschehen analysiert. Die Messdatenerhebung konnte somit nicht zielgerichtet zu bestimmten Ereignissen erfolgen.

6.3.1 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD

Mit der Erstbeschreibung von T_{reg} Zellen durch Sakaguchi und Kollegen 1995 wurde eine Lymphozytensubpopulation charakterisiert, welche die Aktivität allo- und autoreaktiver Effektor-T-Zellen supprimiert und eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der Eigentoleranz spielt (Sakaguchi et al. 1995, Shevach 2001). Im murinen Modell schützte die

Transplantation von $CD4^+CD25^{high}$ Zellen vor einer letalen GvHD, indem diese T_{reg} Zellen die Anzahl von Effektor-T-Zellen stark reduzierten und damit die frühe Expansion alloreaktiver T-Zellen hemmten (Cohen et al. 2002). Zahlreiche Studien am humanen System postulierten fortan eine inverse Korrelation zwischen Schweregrad und Inzidenz der akuten GvHD und der Frequenz von T_{reg} Zellen im Transplantat bzw. des Empfängers (Rezvani et al. 2006, Magenau et al. 2010). Im Folgenden sollen unsere Ergebnisse zum Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach HSZT diskutiert werden.

Mit dieser Studie konnten wir zum ersten Mal den Einfluss von T_{reg} Zellen zum Zeitpunkt vor allogener HSZT auf die Entwicklung einer akuten GvHD darstellen. Die Blutentnahme zum Zeitpunkt vor HSZT fand wie bereits unter 4.2 beschrieben zwischen 39 und 8 Tagen vor der HSZT statt, im Median am Tag 28. Die Patienten waren damit im gleichen Therapiestadium, mit der Konditionierung und GvHD-Prophylaxe wurde noch nicht begonnen. Bei den 24 Patienten, die keine akute GvHD (Grad 0) entwickelten, war die T_{reg} Zellzahl vor Transplantation signifikant höher als bei den 27 Patienten, die an einer akuten GvHD (Grad 1 bis 4) erkrankten ($p = 0,037$). Wir zeigten erstmals eine inverse Korrelation zwischen der T_{reg} Zellzahl des Empfängers zum Zeitpunkt vor HSZT und der späteren Entwicklung einer akuten GvHD. Mit diesem Ergebnis besteht nun die Möglichkeit, bereits vor HSZT Hinweise auf Risikopatienten durch die Bestimmung der T_{reg} Zellzahl zu erhalten. Zusammen mit der Ermittlung anderer Risikofaktoren können daraufhin in Zukunft individuelle GvHD-Prophylaxe-Regime ausgearbeitet werden.

Wie eine hohe T_{reg} Zellzahl beim Patienten vor der HSZT auch nach der Konditionierung Einfluss auf die Entwicklung einer akuten GvHD nehmen kann, ob T_{reg} Zellen des Empfängers trotz Konditionierung überleben und ob diese T_{reg} Zellen weiterhin regulatorische Funktionen ausüben, müssen weitere Studien zeigen. In der Literatur wurden bereits mehrfach memory-like T_{reg} Zellen beschrieben. Diese sind wie alle T_{reg} Zellen $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ und werden zusätzlich durch die Oberflächenmarker $CD45R0^+$ und $CD45RA^-$ beschrieben (Banham et al. 2006). Die schwedischen Kollegen um Grindebacke zeigten, dass die Migration von T_{reg} Zellen ins periphere Gewebe mit einer Zelldifferenzierung zu memory-like T_{reg} Zellen einhergeht (Grindebacke et al. 2009). Memory-T-Zellen besitzen die Fähigkeit, auch nach Jahren eine schnelle und effiziente Immunantwort zu vermitteln (Holländer et al.

2006). Denkbar wäre, dass die memory-like T_{reg} Zellen im peripheren Gewebe überleben und auch nach mehreren Monaten ihre regulatorischen Funktionen ausüben und der Entwicklung einer GvHD entgegen wirken.

Neben der Bestimmung der T_{reg} Zellzahl beim Empfänger untersuchten zahlreiche Studien die T_{reg} Zellzahl im Transplantat oder beim Spender (Wolf et al. 2007, Pabst et al. 2007, Rezvani et al. 2006, Stanzani et al. 2004). In unserer Arbeit war diese Analyse aufgrund von fehlenden konservierten Proben nicht möglich. Die Mehrzahl der Ergebnisse anderer Kollegen zeigte auch hier einen Zusammenhang zwischen einer erniedrigten T_{reg} Zellzahl und der Entwicklung einer akuten GvHD. Da selten mehrere Spender zur Verfügung stehen, ist die Auswahl eines geeigneten Spenders nach der T_{reg} Zellzahl wohl kaum möglich. Doch auch hier kann ein weiterer Risikofaktor ermittelt werden, um auf den einzelnen Patienten abgestimmte GvHD-Prophylaxe-Regime zu entwickeln.

Eine Möglichkeit der individuellen GvHD-Prophylaxe besteht in der Infusion von T_{reg} Zellen. Es wurden bereits mehrere Studien am murinen Modell veröffentlicht, welche die Gabe von T_{reg} Zellen als GvHD Therapie und Prophylaxe postulierten (Cohen et al. 2002, Hoffmann et al. 2002, Taylor et al. 2002, Edinger et al. 2003, Trenado et al. 2003). Es brauchte fast 10 Jahre bis Di Ianni und Kollegen 2011 erstmals zeigten, dass auch beim Menschen die alleinige Gabe von T_{reg} Zellen als GvHD-Prophylaxe bei Hochrisiko-Patienten die Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung einer schweren oder letalen GvHD statistisch signifikant senken kann. 28 Patienten wurden 4 Tage vor einer haploidentischen Transplantation T_{reg} Zellen des Spenders als einzige immunsuppressive Strategie infundiert. Nach der Transplantation einer größeren Zahl konventioneller Spender-T-Zellen erwartete man bei dieser Patientengruppe eine hohe Inzidenz von schwerer und sogar tödlicher GvHD. Die im Voraus infundierten T_{reg} Zellen ermöglichten bei den konditionierten Patienten eine *in vivo* Expansion der T_{reg} Zellen. Nach der Zugabe von konventionellen T-Zellen zusätzlich zum $CD34^{+}$ selektierten Stammzelltransplantat erkrankten überraschender Weise nur 2 Patienten an einer akuten GvHD (\geq Grad 2). Der Großteil der Patienten entwickelte keine klinisch relevante akute GvHD und kein Patient eine chronische GvHD. Es ist zu vermuten, dass die T_{reg} Zellen des Spenders vor der Entwicklung einer GvHD schützten, denn nach Verabreichung einer solch großen Menge konventioneller Spender-T-Zellen ohne pharmakologische Immunsuppression wäre bei nahezu allen Patienten eine tödliche GvHD

zu erwarten gewesen (Di Ianni et al. 2011). Eine weitere Studie der Universität von Minnesota, USA, konnte dieses Ergebnis zwar nicht mit signifikanten Zahlen belegen, da die T_{reg} Zellen zusätzlich zur konventionellen GvHD-Prophylaxe verabreicht wurden, sie zeigte aber, dass keine akute Toxizität nach der Infusion von T_{reg} Zellen entstand und dass die T_{reg} Zellen im Empfänger überlebten (Brunstein et al. 2011).

Die Analyse der T_{reg} Zellzahl zu festgelegten Zeitpunkten nach Transplantation bzw. zum Zeitpunkt des Auftreten einer akuten GvHD kann zwar nicht mehr zur Erarbeitung einer GvHD-Prophylaxe, jedoch für eine optimierte GvHD-Therapie genutzt werden. Wir konnten jedoch aktuelle Forschungsergebnisse, die einen inversen Zusammenhang der T_{reg} Zellzahl beim Empfänger nach Transplantation mit der Entwicklung einer akuten GvHD herstellen, nicht bestätigen (Zorn et al. 2005, Rezvani et al. 2006, Pidalla und Anasetti 2010, Magenau et al. 2010). Wir konnten keinen statistisch signifikanten Unterschied der Zahl $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen in der Gruppe ohne und mit akuter GvHD (Grad 1 bis 4) zum Zeitpunkt Tag 30, Tag 60 sowie Tag 100 nach HSZT darstellen. Dies kann unter anderem an dem verwendeten Studiendesign liegen. Bei der Bildung von Patientengruppen werden in den meisten Veröffentlichungen die Grade 0 und 1 der akuten GvHD nach Glucksberg zusammengefasst. Diese Einteilung beruht auf der klinisch nicht relevanten Ausprägung der akuten GvHD des 1. Grades. Eine Grad 1 GvHD soll zwar nicht zusätzlich immunsupprimiert werden, sie wird aber behandelt. Die Therapie beinhaltet eine topische Applikation von Steroiden und die Optimierung des CsA-Spiegels (Dignan et al. 2012). Damit ist die akute GvHD Grad 1 auch klinisch relevant, weshalb wir oben genannte Einteilung wählten. Eine Homogenisierung der Patientengruppen hinsichtlich bestimmter Risikofaktoren der GvHD, wie beispielsweise Stammzellquelle, Art der Konditionierung und HLA-Kompatibilität, war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da die Fallzahlen dann zu gering für statistisch veritable Aussagen waren.

6.3.2 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die chronische GvHD

Die Ausbildung einer akuten GvHD gehört neben einer HLA-Inkompatibilität zu den wesentlichen Risikofaktoren einer chronischen GvHD (Scheffold et al. 2004). Da wir davon ausgegangen sind, dass die T_{reg} Zellzahl vor HSZT Einfluss auf die Entwicklung einer akuten GvHD nimmt, könnte dies im Verlauf auch Auswirkungen auf die Prävalenz der chronischen

GvHD nehmen. Zwar konnten wir, wie bereits unter 6.2.1 bereits dargelegt, bestätigen, dass Patienten, die zuvor an einer akuten GvHD erkrankten, signifikant häufiger eine chronische GvHD entwickelten, jedoch bestätigte sich nicht die Vermutung, dass die T_{reg} Zellzahl vor HSZT auch Einfluss auf die GvHD-Inzidenz vom chronischen Typ nahm. Die Anzahl der T_{reg} Zellen zu allen Zeitpunkten nach HSZT zeigte sich zwischen den Patientengruppen mit und ohne chronischer GvHD ebenso nicht signifikant different. Auch Angaben in der Literatur stellen sich kontrovers dar. Während der Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD bewiesen scheint, gibt es zu den Auswirkungen auf den chronischen Typ verschiedene Ergebnisse. So konnten beispielsweise die Studien von Zorn, Chen und Fujita einen Zusammenhang zwischen dem Mangel an T_{reg} Zellen und der durch autoimmune Prozesse vermittelten chronischen GvHD nachweisen (Chen et al. 2007, Fujita et al. 2007, Zorn et al. 2005). Eine Studie der Medizinischen Hochschule Hannover konnte nur bei Patienten mit chronischer GvHD, die zuvor auch an einer akuten GvHD erkrankt waren, erniedrigte T_{reg} Zellzahlen ermitteln. Patienten die nur eine GvHD vom chronischen Typ entwickelten, hatten keinen signifikanten Mangel an T_{reg} Zellen (Ukena et al. 2011). Meignin und Kollegen ermittelten vergleichbare $CD25^+CD4^+$ Zellzahlen sowie eine ähnliche FOXP3 Expression auf $CD4^+CD25^+$ Zellen von Patienten mit und ohne chronischer GvHD (Meignin et al. 2005). Abschließend ist die Studie um Perz et al. zu nennen, in der es sogar erhöhte T_{reg} Zellwerte bei Patienten mit chronischer GvHD gab (Perz et al. 2012).

Diese differenten Ergebnisse begründen die Notwendigkeit weiterer Forschungen zum Zusammenhang von T_{reg} Zellen und den immunologischen Prozessen, welche für die Entwicklung einer chronischen GvHD verantwortlich gemacht werden. Einheitliche Studienmodelle mit einer größeren Patientenzahl sind dabei unerlässlich.

6.3.3 Einfluss der T_{reg} Zellen auf die Rezidivrate und das Gesamtüberleben

Die prophylaktische Wirkung von T_{reg} Zellen auf die akute GvHD scheint bewiesen. Wenn man eine neue Therapie etablieren will, müssen zuvor mögliche weitere Auswirkungen überprüft werden. So soll im Folgenden der Einfluss der T_{reg} Zellen auf die Rezidivrate und das Gesamtüberleben diskutiert werden.

Vorab sei ein anderes Beispiel der GvHD-Prophylaxe und damit verbundener Nebenwirkungen genannt. Durch die T-Zell-Depletion der Transplantate wird die GvHD-Rate

deutlich gesenkt. Der GvL-Effekt wird gleichzeitig minimiert, da dieser durch die allophenen T-Lymphozyten, welche durch die Selektion entfernt werden, vermittelt wird. Erhöhte Rezidivraten sind damit verbunden (Ferrara et al. 2009, Schots et al. 2001, Marmont et al. 1991). Gilt Ähnliches für T_{reg} Zellen?

In unserer Studie nahm die T_{reg} Zellzahl zum Zeitpunkt vor HSZT sowie zu allen Zeitpunkten nach HSZT keinen Einfluss auf die Rezidivrate und auf das Gesamtüberleben.

Kollegen des Universitätsklinikums Regensburg zeigten im Mausmodell, dass $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen die GvH-Reaktion hemmen und den GvL-Effekt bewahren können. Die T_{reg} Zellen schützen nach der Infusion von zusätzlichen konventionellen T-Zellen nach HSZT vor einer GvHD und nahmen keinen Einfluss auf die antileukämische Wirkung der konventionellen T-Zellen (Edinger et al. 2003). Weitere Studien legen nahe, dass das Engraftment des Stammzellpräparates nicht behindert wird, die hämatopoetische Rekonstitution wird sogar gefördert (Trenado et al. 2003, Hanash und Levy 2005). Die ersten klinischen Studien zur prophylaktischen bzw. therapeutischen Infusion von T_{reg} Zellen konnten keine akute Toxizität der T_{reg} Zellen nachweisen, sie belegten des Weiteren den inversen Einfluss auf die GvHD-Rate (Brunstein et al. 2011, Di Ianni et al. 2011). Langzeitbeobachtung müssen folgen, um Aussagen zur Rezidivrate sowie zum Gesamtüberleben nach T_{reg} Zell-Infusion treffen zu können.

7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein inverser Zusammenhang zwischen der T_{reg} Zellzahl zum Zeitpunkt vor HSZT und der Erkrankung an einer akuten GvHD dokumentiert werden. Die Bestimmung der T_{reg} Zellzahl vor HSZT könnte als Prognoseparameter für die Entwicklung einer akuten GvHD herangezogen werden.

Aktueller Goldstandard zur phänotypischen Markierung dieser T-Zell-Subpopulation ist FOXP3. Eine Bestimmung des intrazellulären Moleküls ist sowohl zeit- als auch kostenintensiv. Die Quantifizierung durch das Oberflächenmolekül CD127 bietet eine zeit- und kostengünstigere Alternative. Diese wird jedoch kontrovers diskutiert. Damit die T_{reg} Zellzahl als Prognoseparameter Einzug in den klinischen Alltag finden kann, prüften wir die Korrelation zwischen $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen. Beide Nachweismethoden korrelieren hoch signifikant. Damit zeigten wir, dass $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen der Subpopulation der T_{reg} Zellen entsprechen und diese deshalb sehr gut mittels CD127 analysiert werden können. Neben dem Zeit- und Kostenvorteil bietet die Bestimmung mit CD127 die Möglichkeit, die T_{reg} Zellen für weitere therapeutische Zwecke zu verwenden.

Wir konnten mit unserer Arbeit weiterhin bestätigen, dass die T_{reg} Zellen keinen negativen Einfluss auf die Rezidivrate sowie das Gesamtüberleben ausübten. Die Infusion von T_{reg} Zellen als prophylaktische Gabe bei Risikopatienten mit geringer T_{reg} Zellzahl vor HSZT ist damit eine vielversprechende Präventionsmaßnahme zur Vermeidung einer GvHD, ohne andere Hauptkomplikationen nach allogener HSZT zu riskieren. Erste klinische Forschungsergebnisse zur Infusion von T_{reg} Zellen sind vielversprechend (Brunstein et al. 2011, Di Ianni et al. 2011). Ebenfalls wäre eine prophylaktische medikamentöse Expansion der T_{reg} Zellzahl *in vivo* bei einer Patientengruppe mit erniedrigter T_{reg} Zellzahl vor HSZT denkbar. Beispielsweise zeigte eine Studie des Dana-Faber Cancer Institute, Boston, USA, dass eine niedrig dosierte IL-2-Therapie eine chronische GvHD durch eine *in vivo* T_{reg} Zell Expansion behandeln kann (Koreth et al. 2011). Diese individualisierten Verfahren könnten bisherige Standardprophylaxeregime ablösen.

Um unsere Thesen zu validieren, bedarf es künftiger größerer Studien mit einem vergleichbaren Patientenkollektiv.

8 Literaturverzeichnis

Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, Cutler CS, Westervelt P, Woolfrey A, Couban S, Ehninger G, Johnston L, Maziarz RT, Pulsipher MA, Porter DL, Mineishi S, McCarty JM, Khan SP, Anderlini P, Bensinger WI, Leitman SF, Rowley SD, Bredeson C, Carter SL, Horowitz MM, Confer DL; Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. 2012. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med*, 367(16):1487-96.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. 2001. CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol*, 166(5):3008-18.

Appelbaum FR. 2009. Hämatopoetische Stammzelltransplantation. In: Zeitz M, Dietel M, Suttorp N, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. Deutsche Ausgabe der 17. Aufl. Berlin: ABW-Wissenschaftsverlag, 890-896.

Aschan J. 2007. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: conditioning. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007 Jun;20(2):295-310.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. 2001. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 167(3):1245-53.

Baldomero H, Gratwohl M, Gratwohl A, Tichelli A, Niederwieser D, Madrigal A, Frauendorfer K; European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT. 2011. The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant*, 46(4):485-501.

Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. 2006. FOXP3⁺ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol*, 36(11):2832-6.

Banz A, Peixoto A, Pontoux C, Cordier C, Rocha B, Papiernik M. 2003. A unique subpopulation of CD4⁺ regulatory T cells controls wasting disease, IL-10 secretion and T cell homeostasis. *Eur J Immunol*, 33(9):2419-28.

Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, 27(1):20-1.

Bensinger WI. 2012. Allogeneic transplantation: peripheral blood vs. bone marrow. *Curr Opin Oncol*, 24(2):191-6.

Billingham RE. 1966. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*, 62:21-78.

Bittencourt H, Lopes M, de Macedo AV, Teixeira ER, Gomes GG, Ferreira GG, Amaral L, Soares P, Vieira M, Dusse LM. 2009. A retrospective comparison of allogeneic peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2(1):272-7.

Blaise D, Kuentz M, Fortanier C, Bourhis JH, Milpied N, Sutton L, Jouet JP, Attal M, Bordigoni P, Cahn JY, Boiron JM, Schuller MP, Moatti JP, Michallet M. 2000. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Société Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol*, 18(3):537-46.

Bland JM, Altman DG. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1(8476):307-10.

Booth C, Lawson S, Veys P. 2013. The current role of T cell depletion in paediatric stem cell transplantation. *Br J Haematol*, 162(2):177-90.

Brunstein CG, Setubal DC, Wagner JE. 2007. Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol*, 137(1):20-35.

Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, Defor T, Levine BL, June CH, Rubinstein P, McGlave PB, Blazar BR, Wagner JE. 2011. Infusion of ex vivo

expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*, 117(3):1061-70.

Bunin N, Aplenc R, Kamani N, Shaw K, Cnaan A, Simms S. 2003. Randomized trial of busulfan vs total body irradiation containing conditioning regimens for children with acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Blood and Marrow Transplant Consortium study. *Bone Marrow Transplant*, 32(6):543-8.

Carpenter PA, Macmillan ML. 2010. Management of acute graft-versus-host disease in children. *PediatrClin North Am*, 57(1):273-95.

Chang YJ, Weng CL, Sun LX, Zhao YT. 2012. Allogeneic bone marrow transplantation compared to peripheral blood stem cell transplantation for the treatment of hematologic malignancies: a meta-analysis based on time-to-event data from randomized controlled trials. *Ann Hematol*, 91(3):427-37.

Chao NJ, Sullivan KM. 2009. Pharmacologic Prevention of Acute Graft-Versus-Host Disease. In: Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG, Hrsg. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. 4. Aufl. Wiley-Blackwell Verlag, 1257-74.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 265(5176):1237-40.

Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, Keller M, Komorowski R, Drobyski WR. 2007. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 110(10):3804-13.

Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, Begum G, Mahendra P, Craddock C, Moss P, Chakraverty R. 2004. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4+CD25^{high} regulatory T cells. *Blood*, 103(6):2410-6.

- Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med*, 196(3):401-6.
- Cohen JL, Boyer O. 2006. The role of CD4+CD25hi regulatory T cells in the physiopathogeny of graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol*, 18(5):580-5.
- Couriel D, Hosing C, Saliba R, Shpall EJ, Andelini P, Popat U, Donato M, Champlin R. 2006. Extracorporeal photopheresis for acute and chronic graft-versus-host disease: does it work? *Biol Blood Marrow Transplant*, 12(1 Suppl 2):37-40.
- Cozzo C, Larkin J 3rd, Caton AJ. 2003. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 171(11):5678-82.
- Cramer P. 2009. Im Fokus: Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. In: Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Böhm M, Hallek M, Schmiegel W, Hrsg. *Innere Medizin*. 6. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag, 473-475.
- Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. 2001. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, 19(16):3685-91.
- Davies SM, Ramsay NK, Klein JP, Weisdorf DJ, Bolwell B, Cahn JY, Camitta BM, Gale RP, Giralt S, Heilmann C, Henslee-Downey PJ, Herzig RH, Hutchinson R, Keating A, Lazarus HM, Milone GA, Neudorf S, Perez WS, Powles RL, Prentice HG, Schiller G, Socié G, Vowels M, Wiley J, Yeager A, Horowitz MM. 2000. Comparison of preparative regimens in transplants for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 18(2):340-7.
- d'Hennezel E, Bin Dhuban K, Torgerson T, Piccirillo CA. 2012. The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet*, 49(5):291-302.
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. 2001. *J Exp Med*, 193(11):1303-10. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood.

Dignan FL, Clark A, Amrolia P, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, Scarisbrick JJ, Taylor PC, Hadzic N, Shaw BE, Potter MN; Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in Haematology; British Society for Blood and Marrow Transplantation. 2012. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*, 158(1):30-45.

Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF. 2011. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood*, 117(14):3921-8.

DRST. 2010. Deutsches Register für Stammzelltransplantationen, Jahresbericht 2010. www.drst.de/download/jb2019.pdf

Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, Loberiza FR, Champlin RE, Klein JP, Horowitz MM, Wagner JE. 2007. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*, 369(9577):1947-54.

Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*, 9(9):1144-50.

Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet*, 373(9674):1550-61.

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. 2005. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11(12):945-56.

- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22(3):329-41.
- Fujita S, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Fukaya T, Kubo M, Yamashita N, Sato K. 2007. Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood*, 110(10):3793-803.
- Gale RP, Bortin MM, van Bekkum DW, Biggs JC, Dicke KA, Gluckman E, Good RA, Hoffmann RG, Kay HE, Kersey JH, et al. 1987. Risk factors for acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*, 67(4):397-406.
- Gershon RK, Kondo K. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5):723-37.
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. 1974. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, 18(4):295-304.
- Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. 2001. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol*, 29(3):259-77.
- Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ. 1996. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 334(5):281-5.
- Granados E, de La Cámara R, Madero L, Díaz MA, Martín-Regueira P, Steegmann JL, Arranz R, Figuera A, Fernández-Rañada JM. 2000. Hematopoietic cell transplantation in acute lymphoblastic leukemia: better long term event-free survival with conditioning regimens containing total body irradiation. *Haematologica*, 85(10):1060-7.
- Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R, Nayak L, Moss PA. 2005. The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol*, 140(3):540-6.

Griffith LM, Pavletic SZ, Lee SJ, Martin PJ, Schultz KR, Vogelsang GB. 2008. Chronic Graft-versus-Host Disease—implementation of the National Institutes of Health Consensus Criteria for Clinical Trials. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14(4):379-84.

Grindebacke H, Stenstad H, Quiding-Järbrink M, Waldenström J, Adlerberth I, Wold AE, Rudin A. 2009. Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *J Immunol*, 183(7):4360-70.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652):737-42.

Guggenmoos-Holzmänn I, Wernecke, KD. 1996. *Medizinische Statistik*. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschaftsverlag, 160 -164.

Gupta T, Kannan S, Dantkale V, Laskar S. 2011. Cyclophosphamide plus total body irradiation compared with busulfan plus cyclophosphamide as a conditioning regimen prior to hematopoietic stem cell transplantation in patients with leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 4(1):17-29.

Hahn T, McCarthy PL Jr, Zhang MJ, Wang D, Arora M, Frangoul H, Gale RP, Hale GA, Horan J, Isola L, Maziarz RT, van Rood JJ, Gupta V, Halter J, Reddy V, Tiberghien P, Litzow M, Anasetti C, Pavletic S, Ringdén O. 2008. Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia. *J Clin Oncol*, 26(35):5728-34.

Hanash AM, Levy RB. 2005. Donor CD4⁺CD25⁺ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 105(4):1828-36.

Hartman AR, Williams SF, Dillon JJ. 1998. Survival, disease-free survival and adverse effects of conditioning for allogeneic bone marrow transplantation with busulfan/cyclophosphamide vs total body irradiation: a meta-analysis. *Bone Marrow Transplant*, 22(5):439-43.

Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. 2002. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med*, 196(3):389-99.

Holländer GA. 2006. Immunologie – Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299(5609):1057-61.

Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O, Rozman C, Speck B, et al. 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75(3):555-62.

Horwitz ME, Sullivan KM. 2006. Chronic graft-versus-host disease. *Blood Rev*, 20(1):15-27.

Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, Urbano-Ispizua A, Pavletic SZ, Haagenson MD, Zhang MJ, Antin JH, Bolwell BJ, Bredeson C, Cahn JY, Cairo M, Gale RP, Gupta V, Lee SJ, Litzow M, Weisdorf DJ, Horowitz MM, Hahn T. 2012. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 119(1):296-307.

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 193(11):1285-94.

Kalwak K, Gorczyńska E, Toporski J, Turkiewicz D, Słociak M, Ussowicz M, Latos-Grazyńska E, Król M, Boguslawska-Jaworska J, Chybicka A. 2002. Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. *Br J Haematol*, 118(1):74-89.

Karrer S. 2003. Graft-versus-Host-Disease der Haut. *Hautarzt*, 54(5):465-80.

Kim HO, Oh HJ, Lee JW, Jang PS, Chung NG, Cho B, Kim HK. 2013. Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a single institution study of 59 patients. *Korean J Pediatr*, 56(1):26-31.

Klingebiel T, Schlegel PG. 1998. GVHD: overview on pathophysiology, incidence, clinical and biological features. *Bone Marrow Transplant*, 21 Suppl 2:S45-9.

Koc S, Leisenring W, Flowers ME, Anasetti C, Deeg HJ, Nash RA, Sanders JE, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR, Martin PJ. 2002. Therapy for chronic graft-versus-host disease: a randomized trial comparing cyclosporine plus prednisone versus prednisone alone. *Blood*, 100(1):48-51.

Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. 1990. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*, 76(12):2462-5.

Kolb HJ. 2000. Transplantation von Knochenmark und Blutstammzellen. In: Wilmanns W, Huhn D, Wilms K, Hrsg. *Internistische Onkologie*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme Verlag, 261-273.

Kolb HJ. 2003. Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. In: Classen M, Diehl V, Hrsg. *Innere Medizin*. 5. Aufl. München: Urban & Fischer, 172-178.

Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, Hegland J, Kamani N, Kernan NA, King R, Ratanatharathorn V, Weisdorf D, Confer DL. 2001. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*, 98(7):2043-51.

Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP 3rd, Armand P, Cutler C, Ho VT, Treister NS, Bienfang DC, Prasad S, Tzachanis D, Joyce RM, Avigan DE, Antin JH, Ritz J, Soiffer RJ. 2011. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 365(22):2055-66.

Kröger N, Zander A. 2008. *Allogene Stammzelltherapie – Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. 2. Aufl. Bremen: UNI-MED Verlag.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. 2006.

CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 203(7):1701-11.

Meignin V, Peffault de Latour R, Zuber J, Régnault A, Mounier N, Lemaître F, Dastot H, Itzykson R, Devergie A, Cumano A, Gluckman E, Janin A, Bandeira A, Socié G. 2005. Numbers of Foxp3-expressing CD4+CD25high T cells do not correlate with the establishment of long-term tolerance after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol*, 33(8):894-900.

Magenau JM, Qin X, Tawara I, Rogers CE, Kitko C, Schlough M, Bickley D, Braun TM, Jang PS, Lowler KP, Jones DM, Choi SW, Reddy P, Mineishi S, Levine JE, Ferrara JL, Paczesny S. 2010. Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16(7):907-14.

Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA, et al. 1991. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood*, 78(8):2120-30.

Müller R, Büttner P. 1994. A critical discussion of intraclass correlation coefficients. *Stat Med*, 13(23-24):2465-76.

Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P. 2002. CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13):8832-7.

Nadal E, Garin M, Kaeda J, Apperley J, Lechler R, Dazzi F. 2007. Increased frequencies of CD4(+)CD25(high) T(regs) correlate with disease relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 21(3):472-9.

Nestel FP, Price KS, Seemayer TA, Lapp WS. 1992. Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med*, 175(2):405-13.

Nishizuka Y, Sakakura T. 1969. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166(3906):753-5.

Olkinuora H, Talvensaari K, Kaartinen T, Siitonen S, Saarinen-Pihkala U, Partanen J, Vettenranta K. 2007. T cell regeneration in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 39(3):149-56.

Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H. 1996. Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood*, 88(7):2775-9.

Ottinger HD, Müller CR, Goldmann SF, Albert E, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Bunjes D, Casper J, Ebell W, Ehninger G, Eiermann T, Einsele H, Fauser A, Ferencik S, Finke J, Hertenstein B, Heyll A, Klingebiel T, Knipper A, Kremens B, Kolb HJ, Kolbe K, Lenartz E, Lindemann M, Müller CA, Mytilineos J, Niederwieser D, Runde V, Sayer H, Schaefer UW, Schmitz N, Schröder S, Schulze-Rath R, Schwerdtfeger R, Siegert W, Thiele B, Zander AR, Grosse-Wilde H. 2001. Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann Hematol*, 80(12):706-14.

Ottinger HD, Ferencik S, Beelen DW, Lindemann M, Peceny R, Elmaagacli AH, Husing J, Grosse-Wilde H. 2003. Hematopoietic stem cell transplantation: contrasting the outcome of transplantations from HLA-identical siblings, partially HLA-mismatched related donors, and HLA-matched unrelated donors. *Blood*, 102(3):1131-7.

Pabst C, Schirutschke H, Ehninger G, Bornhäuser M, Platzbecker U. 2007. The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR+ and CD4+foxp3+ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Clin Cancer Res*, 13(10):2916-22.

Perz JB, Gürel S, Schonland SO, Hegenbart U, Ho AD, Dreger P. 2012. CD4+CD25highCD127low regulatory T cells in peripheral blood are not an independent factor for chronic graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *ScientificWorldJournal*, 2012:606839.

Pidala J, Anasetti C, Kharfan-Dabaja MA, Cutler C, Sheldon A, Djulbegovic B. 2009. Decision analysis of peripheral blood versus bone marrow hematopoietic stem cells for allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15(11):1415-21.

Pidala J, Anasetti C. 2010. Can antigen-specific regulatory T cells protect against graft versus host disease and spare anti-malignancy alloresponse? *Haematologica*, 95(4):660-5.

Powles R, Mehta J, Kulkarni S, Treleaven J, Millar B, Marsden J, Shepherd V, Rowland A, Sirohi B, Tait D, Horton C, Long S, Singhal S. 2000. Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. *Lancet*, 355(9211):1231-7.

Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus HM, Fu J, Uberti JP. 2001. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy. *Bone Marrow Transplant*, 28(2):121-9.

Remberger M, Mattsson J, Hentschke P, Aschan J, Barkholt L, Svennilson J, Ljungman P, Ringdén O. 2002. The graft-versus-leukaemia effect in haematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*. 2002 Dec;30(11):761-8.

Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, Kilical Y, Savani BN, Zeilah J, Keyvanfar K, Montero A, Hensel N, Kurlander R, Barrett AJ. 2006. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*, 108(4):1291-7.

Ringdén O, Labopin M, Tura S, Arcese W, Iriando A, Zittoun R, Sierra J, Gorin NC. 1996. A comparison of busulphan versus total body irradiation combined with cyclophosphamide as conditioning for autograft or allograft bone marrow transplantation in patients with acute leukaemia. Acute Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol*, 93(3):637-45.

Ringdén O, Remberger M, Ruutu T, Nikoskelainen J, Volin L, Vindeløv L, Parkkali T, Lenhoff S, Sallerfors B, Mellander L, Ljungman P, Jacobsen N. 1999. Increased risk of chronic graft-versus-host disease, obstructive bronchiolitis, and alopecia with busulfan versus total body irradiation: long-term results of a randomized trial in allogeneic marrow recipients with leukemia. Nordic Bone Marrow Transplantation Group. *Blood*, 93(7):2196-201.

Rosenzwajg M, Dhédin N, Maury S, Bensimon G, Landau DA, Norol F, Trébédén-Negre H, Uzunov M, Vernant JP, Klatzmann D, Cohen JL. 2011. Regulatory T cell content in the bone

marrow graft does not predict the occurrence of acute GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17(2):265-9.

Rothe G. 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, Hrsg. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger, 27-70.

Rowlings PA, Przepiorka D, Klein JP, Gale RP, Passweg JR, Henslee-Downey PJ, Cahn JY, Calderwood S, Gratwohl A, Socié G, Abecasis MM, Sobocinski KA, Zhang MJ, Horowitz MM. 1997. IBMTR Severity Index for grading acute graft-versus-host disease: retrospective comparison with Glucksberg grade. *Br J Haematol*, 97(4):855-64.

Rufer N, Wolpert E, Helg C, Tiercy JM, Gratwohl A, Chapuis B, Jeannet M, Goulmy E, Roosnek E. 1998. HA-1 and the SMCY-derived peptide FIDSYICQV (H-Y) are immunodominant minor histocompatibility antigens after bone marrow transplantation. *Transplantation*, 66(7):910-6.

Rupiec RA, Plewig G. 2004. Graft-versus-Host-Disease: Ein interdisziplinäres Problem aus der Sicht des Dermatologen. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2(4):249-59.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3):1151-1164.

Scheffold C, Berdel WE, Kienast J. 2004. Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram CR, Hrsg. *Die Onkologie Teil 1*. Berlin: Springer Verlag, 536-562.

Schmitz N, Bacigalupo A, Hasenclever D, Nagler A, Gluckman E, Clark P, Bourquelot P, Greinix H, Frickhofen N, Ringdén O, Zander A, Apperley JF, Gorin C, Borkett K, Schwab G, Goebel M, Russell NH, Gratwohl A. 1998. Allogeneic bone marrow transplantation vs filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with early leukaemia: first results of a randomised multicentre trial of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 21(10):995-1003.

Schots R, Van Riet I, Ben Othman T, Trullemans F, De Waele M, Van Camp B. 2001. The impact of partial T cell depletion on overall transplant-related toxicity, graft function and survival after HLA-identical allogeneic bone marrow transplantation in standard risk adult patients with leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 28(10):917-22.

Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, Bacigalupo A, Bredeson CN, Bullorsky E, Camitta BM, Champlin RE, Gale RP, Fuhrer M, Klein JP, Locasciulli A, Oneto R, Schattenberg AV, Socie G, Eapen M. 2007. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia. *Blood*, 110(4):1397-400.

Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. 2007. Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J Exp Med*, 204(9):2159-69.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Tangye SG, Alexander SI, Solomon M, Lee S, Nanan R, Fazekas de Saint Groth B. 2006a. Persistence of naive CD45RA⁺ regulatory T cells in adult life. *Blood*, 107(7):2830-8.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. 2006b. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*, 203(7):1693-700.

Seidel MG, Ernst U, Printz D, Juergens B, Pichler J, Attarbaschi A, Fritsch G, Gadner H, Heitger A. 2006. Expression of the putatively regulatory T-cell marker FOXP3 by CD4(+)CD25⁺ T cells after pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*, 91(4):566-9.

Shevach EM. 2001. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med*, 193(11):F41-6.

Shinzato A, Tabuchi K, Atsuta Y, Inoue M, Inagaki J, Yabe H, Koh K, Kato K, Ohta H, Kigasawa H, Kitoh T, Ogawa A, Takahashi Y, Sasahara Y, Kato S, Adachi S. 2013. PBSCT is associated with poorer survival and increased chronic GvHD than BMT in Japanese

paediatric patients with acute leukaemia and an HLA-matched sibling donor. *Pediatr Blood Cancer*, 60(9):1513-9.

Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi MS, Storb R, Thomas ED. 1980. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*, 69(2):204-17.

Simonetta F, Chiali A, Cordier C, Urrutia A, Girault I, Bloquet S, Tanchot C, Bourgeois C. 2010. Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 40(9):2528-38.

Socié G, Clift RA, Blaise D, Devergie A, Ringden O, Martin PJ, Remberger M, Deeg HJ, Ruutu T, Michallet M, Sullivan KM, Chevret S. 2001. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood*, 98(13):3569-74.

Stamatović D, Balint B, Tukić L, Elez M, Tarabar O, Todorović M, Ostojić G, Tatomirovic Z, Ljubenov M, Marjanović S, Malesević M. 2011. Impact of stem cell source on allogeneic stem cell transplantation outcome in hematological malignancies. *Vojnosanit Pregl*, 68(12):1026-32.

Stanzani M, Martins SL, Saliba RM, St John LS, Bryan S, Couriel D, McMannis J, Champlin RE, Molldrem JJ, Komanduri KV. 2004. CD25 expression on donor CD4+ or CD8+ T cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood*, 103(3):1140-6.

Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. 2006. Inhibition of the allergic response by regulatory T cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 6(1):12-6.

Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, Witherspoon RP, Fefer A, Fisher L, Buckner CD, Anasetti C, Appelbaum FR, Badger C, et al. 1989. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood*, 73(6):1720-8.

Szydlo R, Goldman JM, Klein JP, Gale RP, Ash RC, Bach FH, Bradley BA, Casper JT, Flomenberg N, Gajewski JL, Gluckman E, Henslee-Downey PJ, Hows JM, Jacobsen N, Kolb HJ, Lowenberg B, Masaoka T, Rowlings PA, Sondel PM, van Bekkum DW, van Rood JJ, Vowels MR, Zhang MJ, Horowitz MM. 1997. Results of allogeneic bone marrow transplants for leukemia using donors other than HLA-identical siblings. *J Clin Oncol*, 15(5):1767-77.

Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. 2002. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood*, 99(10):3493-9.

Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, Cohen JL. 2003. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest*, 112(11):1688-96.

Ukena SN, Grosse J, Mischak-Weissinger E, Buchholz S, Stadler M, Ganser A, Franzke A. 2011. Acute but not chronic graft-versus-host disease is associated with a reduction of circulating CD4(+)CD25 (high)CD127 (low/-) regulatory T cells. *Ann Hematol*, 90(2):213-8.

Van Rhee F, Kolb HJ. 1995. Donor lymphocyte transfusions for leukemic relapse. *Curr Opin Hematol*, 2(6):423-30.

Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. 1981. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*, 304(25):1529-33.

Weisdorf D, Hakke R, Blazar B, Miller W, McGlave P, Ramsay N, Kersey J, Filipovich A. 1991. Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. *Transplantation*, 51(6):1197-203.

Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*, 27(1):18-20.

Wolf HH, Sayer HG. 2006. Klinische Bedeutung hämatopoetischer Stammzellen. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K, Hrsg. Kompendium Internistische Onkologie – Standards in Diagnostik und Therapie. 4.Aufl. Heidelberg: Springer Medizin, 2299-2317.

Wolf D, Wolf AM, Fong D, Rumpold H, Strasak A, Clausen J, Nachbaur D. 2007. Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*, 83(8):1107-13.

Zhai Z, Sun Z, Li Q, Zhang A, Liu H, Xu J, Xu X, Geng L, Harris D, Hu S, Wang Y. 2007. Correlation of the CD4+CD25^{high} T-regulatory cells in recipients and their corresponding donors to acute GVHD. *Transpl Int*, 20(5):440-6.

Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Litsa D, Arumugarajah S, Bellucci R, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ, Ritz J. 2005. Reduced frequency of FOXP3⁺ CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 106(8):2903-11.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 4.1: Diagnose bei Transplantation
- Abb. 4.2: Vorgehen bei der Auswertung der im Durchflusszytometer gemessenen Daten
- Abb. 5.1: Korrelation $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen im Streudiagramm
- Abb. 5.2: Residuenartige Darstellung nach Bland und Altman zur Darstellung der Korrelation von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ und $CD4^+CD25^+CD127^-$ Zellen
- Abb. 5.3: Quantitativer Nachweis der T_{reg} Zellen aller transplantierten Patienten im Zeitverlauf sowie der Kontrollgruppe
- Abb. 5.4: Vergleich der T_{reg} Zellzahl der Kontrollgruppe mit der Patientengruppe zum Zeitpunkt vor HSZT und an den Tagen 30, 60 sowie 100 nach HSZT
- Abb. 5.5: Verteilung der klinischen Grade der akuten GvHD nach Glucksberg
- Abb. 5.6: Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD zum Zeitpunkt vor HSZT
- Abb. 5.7: Einfluss der T_{reg} Zellen auf die akute GvHD an den Tagen 30, 60 und 100 nach HSZT
- Abb. 5.8: Einfluss der T_{reg} Zellen auf die chronische GvHD zum Zeitpunkt vor HSZT und an den Tagen 30, 60 sowie 100 nach HSZT
- Abb. 5.9: Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Entstehen eines Rezidivs zum Zeitpunkt vor HSZT und an den Tagen 30, 60 sowie 100 nach HSZT
- Abb. 5.10: Einfluss der T_{reg} Zellen auf das Gesamtüberleben zum Zeitpunkt vor HSZT und an den Tagen 30, 60 sowie 100 nach HSZT

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Organstadien der akuten GvHD nach Glucksberg
Tab. 4.1:	Konditionierung
Tab. 4.2:	Patientencharakteristika
Tab. 4.3:	Zusammenstellung der verwendeten Reagenzien mit Hersteller
Tab. 4.4:	Zusammenstellung der verwendeten Geräte mit Hersteller
Tab. 4.5:	Verwendete Antikörper für die Oberflächenfärbung
Tab. 4.6:	Verwendete Antikörper für die intrazelluläre Färbung
Tab. 4.7:	Verwendete Antikörper für die Isotypenkontrolle

10 Anhang

10.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Herr PD Dr. med. Bernd Gruhn (Leiter Sektion Hämatologie/Onkologie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena)
- Herr Dr. rer. nat. Ralf Häfer (Hämatologisches Labor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena)
- Frau Ilona Wolff (Medizinische Dokumentation, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, FSU Jena)
- Frau Dipl.-Math. Antje Brandstädt (Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation, FSU Jena)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 27. Oktober 2013

Anne Skorna

10.2 Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle all den Menschen, die durch ihre fachliche oder emotionale Unterstützung ihren Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich **Herrn PD Dr. Bernd Gruhn** für die freundliche Überlassung des Themas und die engagierte Betreuung während jeder Phase der Entstehung der vorliegenden Dissertation. Seine stetige Motivationshilfe und konstruktive Kritik haben einen entscheidenden Anteil zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Die hilfsbereite, freundliche und kompetente Einweisung in die Methoden und Verfahren der Zellaufarbeitung und Durchflusszytometrie, sowie die Unterstützung bei der Arbeit im Labor durch **Herrn Dr. Ralf Häfer** und den **Mitarbeiterinnen des hämatologischen Labors** gewährleisteten die korrekte Gewinnung und Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Frau Dr. Antje Brandstädt vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der FSU Jena sei für die geduldige Beratung zur Statistik herzlich gedankt.

Ich möchte mich **bei Frau Ilona Wolff** für die freundliche Bereitstellung der mühevoll gesammelten Patientendaten bedanken.

Meinen einzigartigen **Freunden**, die Kraftgeber, Problemlöser, Ideenschenker und Zuhörer zugleich waren, gilt mein unbezahlbarer Dank. Danke **Jakob** für die Überseehilfe bei unüberwindbaren Translationshürden, Danke **Marie-Theres** für die Erlangung unübertroffener Fähigkeiten Geschriebenes in passende Formen zu bringen, Danke **Susann** für deinen grammatikalisch korrekten Enthusiasmus, Danke **Ulrike** für die letzten Komma. Danke an meine lieben **Kollegen der Kinderchirurgie** für offene Ohren, aufmunternde Worte und eine Dienstplanung, die die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Ohne die mentale und finanzielle Unterstützung **meiner Eltern** wäre das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Danke **den drei Prinzen** für eure unendliche Geduld!